

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SASSARI**

***XXII CICLO DI DOTTORATO***

**SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE BIOMEDICHE**

**IL FIBROSCAN:**

**UNA METODICA INNOVATIVA PER LA VALUTAZIONE  
NON INVASIVA DELLA FIBROSI EPATICA**

***Coordinatore***

***Prof.ssa Maria Stella Mura***

***Tutore***

***Prof.ssa Gloria Taliani***

***Dottorando***

***Dott.ssa Biliotti Elisa***

***Anno Accademico 2008/2009***

## INDICE

### **PARTE INTRODUTTIVA**

<i>Introduzione.....</i>	<i>3</i>
<i>La fibrosi epatica.....</i>	<i>4</i>
<i>Classificazione del danno epatico.....</i>	<i>10</i>
<i>Metodi invasivi di valutazione della fibrosi epatica.....</i>	<i>17</i>
<i>Biopsia epatica.....</i>	<i>17</i>
<i>Metodi non invasivi di valutazione della fibrosi epatica.....</i>	<i>21</i>
<i>Marcatori indiretti di fibrosi epatica.....</i>	<i>22</i>
<i>Marcatori diretti di fibrosi epatica.....</i>	<i>26</i>
<i>Associazione di marcatori indiretti e diretti di fibrosi epatica.....</i>	<i>29</i>
<i>Elastometria epatica ad impulsi (FibroScan).....</i>	<i>32</i>

### **PARTE SPERIMENTALE I**

<i>L'elastometria epatica ad impulsi (FibroScan) nella stadiazione delle epatopatie virali croniche.....</i>	<i>39</i>
<i>Introduzione.....</i>	<i>39</i>
<i>Pazienti e metodi.....</i>	<i>39</i>
<i>Risultati.....</i>	<i>42</i>
<i>Discussione e conclusioni.....</i>	<i>46</i>

## **PARTE SPERIMENTALE II**

<i>Elastometria epatica ad impulsi (FibroScan) ed epatite acuta.....</i>	<i>50</i>
<i>Introduzione.....</i>	<i>50</i>
<i>Pazienti e metodi.....</i>	<i>50</i>
<i>Risultati.....</i>	<i>52</i>
<i>Discussione e conclusioni.....</i>	<i>55</i>

## **PARTE SPERIMENTALE III**

<i>Elastometria epatica ad impulsi (FibroScan) e trattamento dialitico.....</i>	<i>57</i>
<i>Introduzione.....</i>	<i>57</i>
<i>Pazienti e metodi.....</i>	<i>58</i>
<i>Risultati.....</i>	<i>59</i>
<i>Discussione e conclusioni.....</i>	<i>63</i>
 <i>Bibliografia.....</i>	 <i>66</i>

## ***Introduzione***

La fibrosi epatica, ovvero la sostituzione del parenchima epatico con matrice extracellulare, rappresenta la caratteristica principale della maggior parte delle patologie croniche epatiche. Nei paesi industrializzati le patologie più frequentemente associate allo sviluppo di fibrosi epatica comprendono l'epatite C cronica, l'epatopatia alcolica, la steatoepatite non alcolica (NASH) e l'epatite B cronica.

La prognosi e le scelte terapeutiche nei pazienti con epatopatie croniche sono strettamente correlate all'entità della fibrosi epatica, in particolar modo è indispensabile identificare coloro che presentano un'epatopatia avanzata o una cirrosi epatica al fine di effettuare le scelte terapeutiche corrette e gestire le eventuali complicanze.

Attualmente siamo in un'epoca in cui la biopsia epatica, lo storico “*gold standard*” per la valutazione della fibrosi epatica, è stata sottoposta ad un'attenta valutazione critica. La biopsia epatica è infatti una procedura invasiva non priva di complicanze, benché poco frequenti, è una metodica costosa e la sua accuratezza diagnostica è influenzata da errori di campionamento e dalla variabilità di interpretazione inter e intra-osservatore. Queste limitazioni possono determinare una sottostima della fibrosi o della cirrosi epatica, specialmente se il campione bioptico non è di dimensioni adeguate o è frammentato.

Negli ultimi anni la ricerca di nuove metodiche non invasive per la determinazione della fibrosi epatica ha avuto un grande sviluppo, è stata pertanto favorita la ricerca sia di markers sierici che di metodiche strumentali.

I marcatori sierici di fibrosi individuati appartengono a due gruppi principali: indiretti e diretti. I marcatori indiretti riflettono alterazioni della funzionalità epatica indotte dalla fibrosi, i marcatori diretti invece riflettono i cambiamenti indotti sulla matrice extracellulare dalla fibrogenesi. La loro performance diagnostica, oltre ad essere fortemente influenzata da condizioni extraepatiche, è piuttosto lontana dall'essere ottimale soprattutto per la valutazione della fibrosi epatica severa e della cirrosi epatica.

In questo contesto si inserisce la misurazione della fibrosi epatica mediante l'elastometria ad impulsi (FibroScan, *Echosens, Parigi, Francia*), che consente di definire in modo non invasivo e rapido l'entità della fibrosi epatica e di monitorizzare il suo andamento nel tempo. Essendo una metodica diagnostica di recente introduzione nella pratica clinica è di fondamentale importanza definirne l'accuratezza diagnostica e identificare i potenziali fattori confondenti in grado di alterare il risultato dell'esame, determinando di conseguenza una sovrastima o una sottostima della fibrosi epatica.

## LA FIBROSI EPATICA

La fibrosi epatica, ovvero la sostituzione del parenchima epatico con matrice extracellulare, rappresenta la caratteristica principale della maggior parte delle patologie croniche epatiche (Friedman 2003). Nei paesi industrializzati le patologie più frequentemente associate allo sviluppo di fibrosi epatica comprendono l'epatite C cronica, l'epatopatia alcolica, la steatoepatite non alcolica (NASH) e l'epatite B cronica. L'accumulo di proteine della matrice extracellulare al livello epatico determina una progressiva alterazione dell'architettura del fegato, caratterizzata dalla formazione di setti fibrosi inizialmente e di noduli di rigenerazione successivamente, concludendosi con lo sviluppo della cirrosi. La cirrosi è causata a sua volta dalla disfunzione epatocellulare e determina un incremento di resistenza al livello della circolazione ematica epatica con conseguente sviluppo dell'insufficienza epatica e dell'ipertensione portale, rispettivamente (Gines 2004).

Inizialmente la fibrosi epatica è un processo insidioso e la morbidità e mortalità ad essa correlata si manifestano generalmente in seguito allo sviluppo della cirrosi. Nella maggior parte dei pazienti la progressione verso la cirrosi avviene in un periodo di tempo di 15-20 anni. Le principali complicanze della cirrosi comprendono l'ascite, l'insufficienza renale, l'encefalopatia epatica e il sanguinamento di varici. I pazienti con cirrosi compensata possono non sviluppare complicanze per molti anni, la cirrosi scompensata si associa invece ad una ridotta sopravvivenza e l'unica strategia terapeutica efficace è rappresentata in questo caso dal trapianto di fegato. La cirrosi rappresenta inoltre un fattore di rischio per lo sviluppo del carcinoma epatocellulare (Davis 2003).

Negli ultimi anni sono stati fatti progressi sostanziali nella comprensione dei meccanismi che regolano la fibrogenesi. In passato si riteneva che la fibrosi epatica fosse un processo passivo e irreversibile conseguente alla scomparsa di parenchima epatico e alla sua sostituzione con un tessuto ricco di collagene (Popper 1970, Schaffner 1968). Attualmente viene considerata espressione dinamica di due processi biologici contrapposti, ossia la sintesi e la rimozione di matrice extracellulare, in risposta ad una noxa patogena cronica. Queste conoscenze ci hanno fornito una spiegazione razionale e plausibile della reversibilità del processo fibrotico.

Uno dei momenti fondamentali nella comprensione della fibrosi epatica è rappresentato dall'identificazione delle cellule stellate epatiche (HSCs), denominate anche lipociti o cellule di Ito o cellule perisinusoidali, quali elementi essenziali per la produzione di collagene al livello epatico. Questo tipo di cellule, descritte per la prima volta da Kupffer nel 1876, subiscono un radicale cambiamento fenotipico in presenza di epatopatie croniche con conseguente acquisizione di proprietà fibrogeniche (Geerts 2001). Oltre alle cellule stellate epatiche anche i miofibroblasti

portali e cellule provenienti dal midollo osseo sembrano possedere potenzialità fibrogeniche (Ramadori 2004, Forbes 2004) (Figura 1).

La storia naturale della fibrosi epatica è influenzata sia da fattori genetici che ambientali.

Gli studi epidemiologici hanno permesso l'identificazione di numerosi polimorfismi genici che potrebbero influenzare la progressione della fibrosi epatica nell'uomo. I suddetti fattori genetici potrebbero spiegare l'ampio spettro di risposte al medesimo agente patogeno identificate nei pazienti con epatopatie croniche (Bataller 2003). I geni che regolano l'apoptosi e/o la necrosi epatocellulare (es. Bcl-xL, Fas) influenzano l'estensione del danno epatico e la conseguente risposta fibrogenica (Takehara 2004, Canbay 2002). I geni che regolano la risposta infiammatoria al danno epatico (es. IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-13, IFN- $\gamma$ , SOCS-1 e osteopontina) determinano la risposta fibrogenica al danno stesso (Safadi 2004, Sahai 2004, Yoshida 2004, Streetz 2003). I geni che mediano la produzione di ROS (es. NADPH ossidasi) regolano sia la risposta infiammatoria che la deposizione di matrice extracellulare (Bataller 2003). I fattori di crescita fibrogenici (es. TGF- $\beta$ 1, FGF), le sostanze vasoattive (angiotensina II, norepinefrina) e le adipochine (leptina e adiponectina) sono tutti elementi necessari per lo sviluppo della fibrosi (Oben 2004, Yu 2003, Kamada 2003, Kanno 2003). Infine la rimozione del collagene in eccesso in seguito all'eliminazione dello stimolo lesivo è regolata da TIMP-1 e TGF- $\beta$ 1 (Ueberham 2003, Yoshiji 2002).

In seguito ad uno stimolo lesivo acuto al livello del fegato (es. infezione da virus epatitici), le cellule parenchimali si rigenerano e sostituiscono le cellule necrotiche o apoptotiche. Questo processo determina una risposta infiammatoria e una limitata deposizione di matrice extracellulare. Se lo stimolo lesivo persiste, le cellule epatiche non sono più in grado di rigenerarsi e gli epatociti vengono sostituiti da abbondante matrice extracellulare, composta prevalentemente da fibre collagene. La disposizione del tessuto fibroso dipende dal tipo di stimolo lesivo. Nelle epatiti virali croniche e nelle epatopatie colestatiche il tessuto fibroso si localizza inizialmente al livello degli spazi portali, invece nelle epatopatie alcoliche si localizza nelle aree perisinusoidali (Pinzani 1999).

La fibrosi epatica è caratterizzata da alterazioni sia della quantità che della composizione della matrice extracellulare. Negli stadi avanzati di fibrosi il fegato contiene un quantitativo di matrice extracellulare circa sei volte superiore rispetto al normale, costituito prevalentemente da collagene (I, III e IV), fibronectina, undulina, elastina, laminina, acido ialuronico e proteoglicani. L'accumulo di matrice extracellulare è causato da un aumento della sua sintesi e da una riduzione della sua degradazione. La ridotta attività delle metallo-proteinasi (MMP), enzimi deputati alla

degradazione della matrice extracellulare, dipende essenzialmente dall'incremento dei loro specifici inibitori (TIMPs) (Arthur 2000).

Le cellule stellate epatiche (HSCs) sono le principali responsabili della produzione di matrice extracellulare al livello del fegato danneggiato. Nel fegato normale le HSCs sono localizzate al livello degli spazi di Disse e svolgono la funzione di depositi di vitamina A. Nel corso del danno epatico le HSCs si attivano differenziandosi in miofibroblasti proliferanti e fibrogenici (Marra 1999). Le HSCs attivate migrano e si accumulano al livello del tessuto danneggiato, producendo una gran quantità di matrice extracellulare e regolandone la degradazione. Il PDGF, prodotto principalmente dalle cellule di Kupffer, è il più importante agente mitogeno per le HSCs. La sintesi di collagene nelle HSCs è regolata sia al livello trascrizionale che post-trascrizionale (Lindquist 2000). L'incremento di stabilità dell'RNA messaggero del collagene determina una maggiore produzione di tale proteina da parte delle HSCs attivate. Inoltre in queste cellule, la regolazione post-trascrizionale della sintesi di collagene dipende dall'interazione tra la proteina aCP2 legante l'RNA e sequenze situate sia al livello della regione 3' non codificante che al livello della regione 5' dell'RNA messaggero del collagene (Lindquist 2004).

Oltre alle cellule stellate epatiche altre linee cellulari possiedono potenzialità fibrogeniche. I miofibroblasti provenienti dai piccoli vasi portalari proliferano attorno alle vie biliari iniziando la deposizione di collagene nella fibrosi epatica causata da patologie colestatiche (Kinnman 2002). Inoltre esperimenti di coltura in vitro di cellule staminali emopoietiche CD34+ CD38- con diversi fattori di crescita hanno condotto alla differenziazione di cellule stellate epatiche (HSCs) e di miofibroblasti di derivazione midollare in grado di localizzarsi al livello del tessuto epatico umano determinando un rimodellamento dell'architettura tissutale (Suskind 2004). Questi dati suggeriscono che cellule provenienti dal midollo osseo possono essere in grado di diventare cellule fibrogeniche al livello del fegato danneggiato. L'importanza relativa di ciascuna linea cellulare nella patogenesi della fibrosi epatica dipende dalla tipologia dello stimolo lesivo che la determina.

Una complessa interazione tra differenti linee cellulari si verifica durante la fibrogenesi epatica. Gli epatociti sono il bersaglio della maggior parte degli stimoli lesivi, quali i virus epatitici, i metaboliti dell'alcool e gli acidi biliari (Higuchi 2003). Gli epatociti danneggiati producono ROS e mediatori fibrogenici con conseguente richiamo di cellule infiammatorie. L'apoptosi degli epatociti danneggiati stimola la produzione di collagene da parte dei miofibroblasti epatici (Canbay 2004). Le cellule dell'infiammazione, sia i linfociti che i polimorfonucleati, attivano le cellule stellate epatiche con conseguente produzione di collagene (Casini 1997). Le cellule stellate epatiche attivate secernono chemochine infiammatorie, esprimono molecole di adesione cellulare e modulano

l'attivazione dei linfociti (Vinas 2003). Pertanto si instaura un circolo vizioso in cui le cellule stellate epatiche e le cellule infiammatorie si stimolano a vicenda (Maher 2001). Il processo fibrogenico è inoltre influenzato dai differenti sottotipi di linfociti T helper presenti, essendo la risposta Th2 associata ad una fibrogenesi più attiva (Shi 1997). Le cellule di Kupffer sono macrofagi residenti che svolgono un ruolo importante nella flogosi epatica rilasciando ROS e citochine (Naito 2004, Thurman 1998). Infine cambiamenti nella composizione della matrice extracellulare sono in grado di stimolare direttamente la fibrogenesi. Il collagene di tipo IV, il fibrinogeno e l'attivatore del plasminogeno tipo urochinasi stimolano le cellule stellate epatiche mediante l'attivazione di citochine latenti quali il TGF- $\beta$ 1 (Gressner 2002). Le fibre di collagene si legano e stimolano le cellule stellate epatiche mediante il recettore DDR2. Inoltre la matrice extracellulare alterata può fungere da reservoir per fattori di crescita e metallo-proteinasi (MMPs) (Olaso 2001).

Le citochine che regolano la risposta infiammatoria allo stimolo lesivo modulano la fibrogenesi epatica sia in vivo che in vitro (Marra 2002). La proteina chemotattica monocitaria di tipo 1 e RANTES stimolano la fibrogenesi, mentre l'IL10 e l'IFN  $\gamma$  esercitano l'effetto opposto (Schwabe 2003). Tra i fattori di crescita, il TGF- $\beta$ 1 sembra essere un mediatore chiave nella fibrogenesi umana. Il TGF- $\beta$ 1 favorisce la trasformazione delle cellule stellate epatiche (HSCs) in cellule simili ai miofibroblasti, stimola la sintesi di proteine della matrice extracellulare e inibisce la loro degradazione (Shek 2004). Il fattore di crescita derivante dalle piastrine (PDGF) è il più potente mitogeno per le cellule stellate epatiche e la sua produzione è aumentata nel fegato fibrotico (Borkham-Kamphorst 2004).

Le citochine con proprietà vasoattive regolano la fibrogenesi epatica. Le sostanze vasodilatatrici (es. ossido nitrico, relaxina) esercitano effetti antifibrotici, invece le sostanze vasocostrittrici (es. norepinefrina, angiotensina II) hanno effetti opposti (Williams 2001). Tra le citochine vasoattive l'angiotensina II sembra svolgere un ruolo importante nella fibrogenesi epatica. L'angiotensina II è il peptide effettore del sistema renina-angiotensina, che è il principale sistema di controllo della pressione arteriosa nell'uomo. I componenti essenziali di questo sistema sono localmente espressi nel fegato cronicamente danneggiato e le cellule stellate epatiche attivate producono angiotensina II (Cho 2000, Paizis 2002). L'angiotensina II causa flogosi epatica e stimola la proliferazione e la migrazione delle cellule stellate epatiche, nonché la produzione di citochine pro-infiammatorie e la sintesi di collagene (Bataller 2003). Le adipochine, citochine prodotte dal tessuto adiposo, regolano la fibrogenesi epatica. La leptina è indispensabile per



l'attivazione delle cellule stellate epatiche e lo sviluppo di fibrosi (Marra 2002, Ikejima 2002). Al contrario l'adiponectina inibisce la fibrogenesi epatica sia in vivo che in vitro (Kamada 2003).

I meccanismi fisiopatologici tramite cui HBV e HCV inducono fibrosi epatica sono noti solo in parte. Nell'epatite cronica da HBV la patogenesi della fibrosi è correlata con alcune citochine, in particolare TGF- $\beta$ 1 (Koziel 1999). Il virus dell'epatite C induce stress ossidativo e richiamo di cellule infiammatorie che favoriscono l'attivazione delle HSC e l'accumulo di collagene. Inoltre, alcune proteine di HCV stimolano direttamente i processi fibrogenici e flogistici mediati dalle HSC (Bataller 2004, Schulze-Krebs 2005).

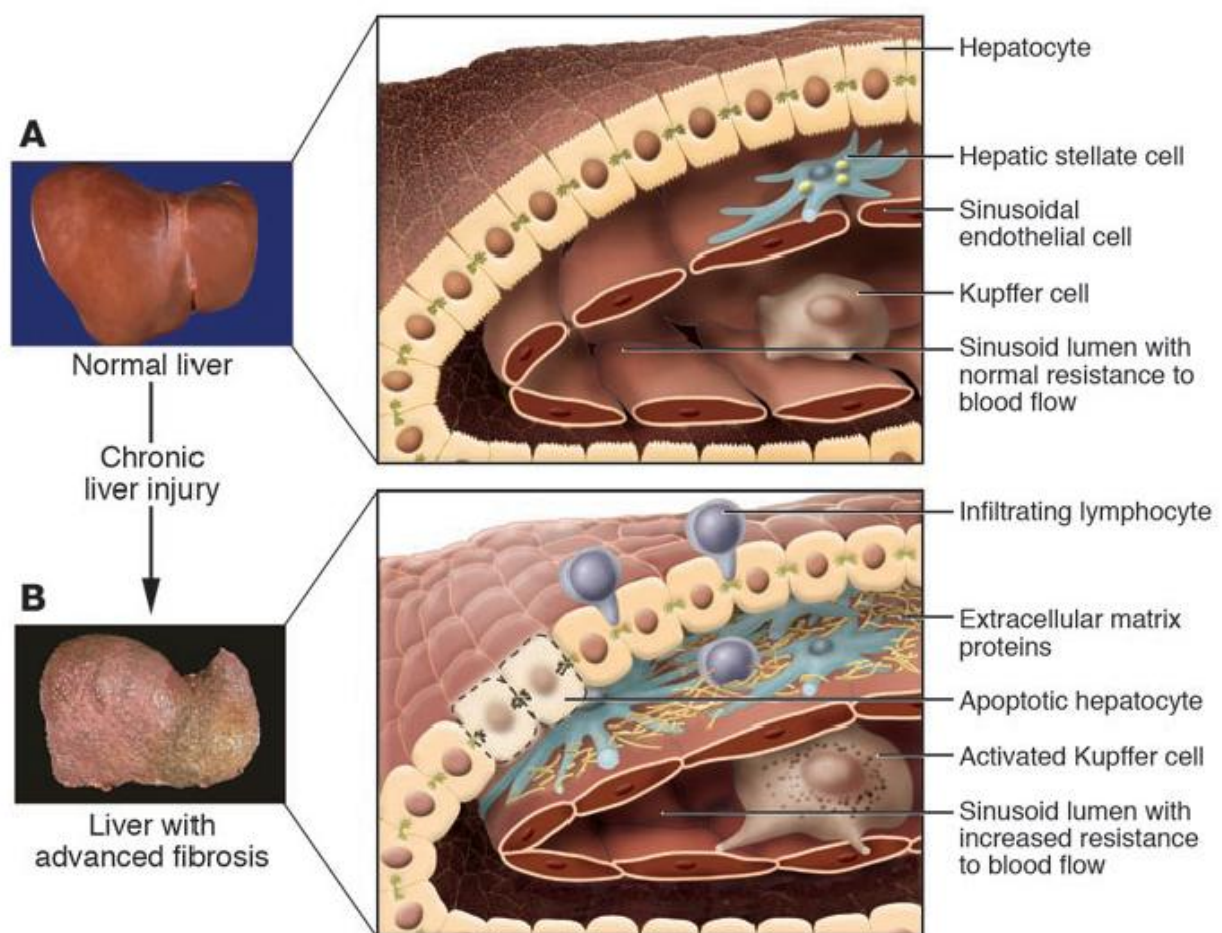


Figura 1. Cambiamenti nell'architettura epatica associati alla fibrosi epatica severa.

In seguito allo stimolo lesivo epatico le cellule infiammatorie infiltrano il parenchima epatico, gli epatociti vanno incontro ad apoptosi e le cellule di Kupffer si attivano, rilasciando mediatori fibrogenici. Le cellule stellate epatiche (HSCs) proliferano e si attivano, secernendo una grande quantità di proteine della matrice extracellulare. Le cellule endoteliali sinusoidali perdono le loro fenestrazioni capillarizzandosi e la contrazione tonica delle cellule stellate epatiche causa un incremento di resistenza al flusso ematico al livello dei sinusoidi epatici (Bataller 2005).

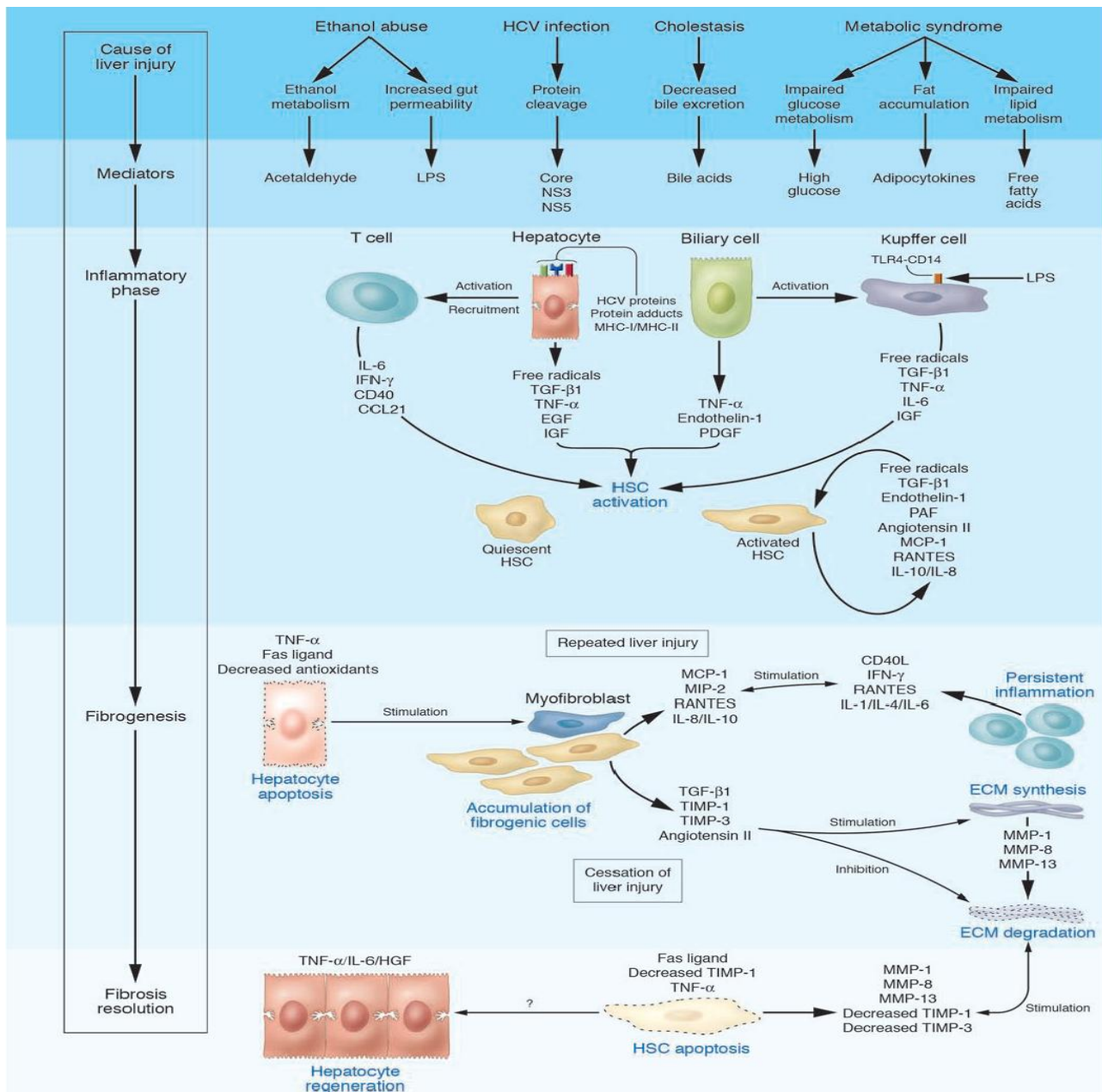


Figura 2. Meccanismi cellulari della fibrosi epatica.

Differenti agenti epatotossici producono mediatori che inducono una risposta infiammatoria al livello degli epatociti. Gli epatociti e le cellule dell'epitelio biliare danneggiate rilasciano citochine infiammatorie e fattori solubili che attivano le cellule di Kupffer e favoriscono il reclutamento di linfociti T attivati. Questo quadro infiammatorio determina la trasformazione delle cellule stellate epatiche residenti in miofibroblasti fibrogenici. Le cellule stellate epatiche (HSCs) attivate secernono citochine che perpetuano il loro stato di attivazione. Se lo stimolo lesivo epatico persiste, le HSCs e i miofibroblasti portal si accumulano, sintetizzando una grande quantità di proteine della matrice extracellulare e determinando lo sviluppo di fibrosi tissutale. La degradazione della matrice extracellulare viene inibita. L'apoptosi degli epatociti danneggiati stimola l'attività fibrogenica delle HSCs. Se la causa di danno epatico viene rimossa, la fibrosi si risolve. Questa fase include l'apoptosi delle cellule stellate epatiche attivate e la rigenerazione degli epatociti. Il collagene viene degradato da un incremento di attività delle metallo-proteinasi (MMPs) indotta da una ridotta espressione di inibitori delle metallo-proteinasi (TIMPs) (Bataller 2005).

## ***CLASSIFICAZIONE DEL DANNO EPATICO***

L'esame istologico del campione biotico è l'unico metodo in grado di fornire al clinico una fotografia dell'epatopatia, mediante la determinazione dell'attività necroinfiammatoria o "*grading*" e del grado di fibrosi o "*staging*".

### **Grading**

Il *grading* è una valutazione istologica dell'attività necroinfiammatoria epatica, per definirlo devono essere valutate le seguenti caratteristiche istologiche:

1. Entità dell'infiltrato infiammatorio (costituito da linfociti e rare plasmacellule) al livello degli spazi portal, comprendenti i rami dell'arteria epatica e della vena porta nonché i dotti biliari interlobulari posti all'interno di una matrice fibroconnettivale.
2. Entità della necrosi periportale e della distruzione della lamina limitante di epatociti periportal indotte dalle cellule infiammatorie, la caratteristica epatite di interfaccia o "*piecemel necrosis*".
3. Entità della necrosi confluyente che supera la lamina limitante e unisce o forma ponti tra strutture vascolari, ossia tra spazi portal e spazi portal o, ancor più importante, tra spazi portal e vena centro-lobulare, con comparsa della caratteristica necrosi a ponte o "*bridging necrosis*".
4. Entità della degenerazione degli epatociti e della necrosi focale all'interno del lobulo.

Il complesso di questi dati fornisce il *grading* istologico della malattia (Chen 1988, Okuno 1983).

### **Staging**

Lo *staging* è una valutazione istologica dell'entità della fibrosi epatica e riflette il livello di progressione della patologia.

### **Sistemi semiquantitativi per la stima del danno istologico**

Al fine di graduare, almeno in modo approssimativo, le suddette alterazioni istologiche sono stati elaborati dei sistemi di punteggio semiquantitativi standardizzati, di cui quattro sono utilizzati nella pratica clinica.

#### **Knodell**

Nel 1981 Knodell e colleghi hanno proposto un sistema a punteggio basato sull'indice numerico di attività istologica (*numerical histologic activity index*, HAI).

Il modello prevede 4 punteggi separati per ogni componente della lesione:

- da 0 a 10 per la necrosi periportale con o senza necrosi a ponte
- da 0 a 4 per la degenerazione intralobulare e necrosi focale
- da 0 a 4 per l'infiammazione portale
- da 0 a 4 per la fibrosi.

Le prime tre categorie valutano complessivamente l'intensità dell'attività infiammatoria (*grading*) mentre la quarta indica il grado di fibrosi (*staging*) (Tabella I) (Knodell 1981).

E' importante sottolineare che in questo modello si utilizzano punteggi di fibrosi in scala discontinua, infatti la fibrosi è così classificata:

0 = assente

1 = espansione fibrosa portale

3 = fibrosi a ponte (porto-portale o porto-centrale)

4 = cirrosi

La somma degli score viene riportata come HAI della biopsia.

Il limite principale di questo sistema è quello di raggruppare attività necro-infiammatoria e fibrosi, mentre tali parametri descrivono lesioni di tipo differente ed hanno diversa implicazione prognostica (Brunt 2000).

.

CARATTERISTICHE ISTOLOGICHE	GRAVITA'	PUNTEGGIO
Necrosi periportale inclusa la <i>piecemenal necrosis</i> (PN) e la <i>bridging necrosis</i> (BN)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nessuna</li> <li>• PN lieve</li> <li>• PN moderata</li> <li>• PN marcata</li> <li>• PN + BN moderata</li> <li>• PN + BN marcata</li> <li>• Necrosi multi lobulare</li> </ul>	0 1 3 4 5 6 10
Necrosi intralobulare	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nessuna</li> <li>• Lieve</li> <li>• Moderata</li> <li>• Marcata</li> </ul>	0 1 3 4
Infiammazione portale	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nessuna</li> <li>• Lieve</li> <li>• Moderata</li> <li>• Marcata</li> </ul>	0 1 3 4
Fibrosi	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nessuna</li> <li>• Spazi portali espansi</li> <li>• Fibrosi a ponte</li> <li>• Cirrosi</li> </ul>	0 1 3 4
Punteggio massimo		22

Tabella I. Indice di attività istologica di Knodell (HAI).

La necessità di definire in modo accurato lo *staging* della malattia ha reso necessaria l'introduzione di alcune modifiche a questo sistema e ha determinato lo sviluppo di tre nuovi sistemi di punteggio che tenessero distinto lo score da assegnare all'attività necroinfiammatoria da quello destinato alla fibrosi.

### Ishak

Nel 1994 Ishak e colleghi propongono una revisione del modello di Knodell apportandovi alcune modifiche, infatti, utilizzando una scala continua di valori descrivono il grado di attività e lo stadio di fibrosi come due parametri separati (Ishak 1995).

La valutazione del *grading* viene effettuata considerando separatamente le diverse forme di necrosi e attribuendo un punteggio massimo di 18 per la componente necro-infiammatoria (Tabella II).

CARATTERISTICHE ISTOLOGICHE	GRAVITA'	PUNTEGGIO
<i>Piecemeal necrosis</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Assente</li> <li>Lieve</li> <li>Lieve/Moderata</li> <li>Moderata</li> <li>Severa</li> </ul>	0 1 2 3 4
<i>Bridging necrosis</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Assente</li> <li>Necrosi confluyente focale</li> <li>Necrosi in zonula 3 (in alcune aree)</li> <li>Necrosi in zonula 3 (in numerose aree)</li> <li>Necrosi in zonula 3 + occasionali ponti porto-centrali</li> <li>Necrosi in zonula 3 + multipli ponti porto-centrali</li> <li>Necrosi panacinare o multiacinare</li> </ul>	0 1 2 3 4 5 6
Necrosi focale litica, apoptosi, infiammazione focale	<ul style="list-style-type: none"> <li>Assente</li> <li>Un solo focus</li> <li>Da 2 a 4 foci</li> <li>Da 5 a 10 foci</li> <li>Più di 10 foci</li> </ul>	0 1 2 3 4
Infiammazione portale	<ul style="list-style-type: none"> <li>Nessuna</li> <li>Lieve</li> <li>Moderata</li> <li>Moderata/Marcata</li> <li>Marcata</li> </ul>	0 1 2 3 4
Punteggio massimo		18

Tabella II. *Grading* istologico secondo Ishak.

La valutazione dello *staging* viene effettuata utilizzando una scala continua di valori e attribuendo un punteggio massimo di 6 per lo stadio di fibrosi (Tabella III).

CARATTERISTICHE ISTOLOGICHE	PUNTEGGIO
Assenza di fibrosi	0
Ingrandimento fibrotico di alcuni spazi portalì	1
Ingrandimento fibrotico della maggior parte degli spazi portalì	2
Ingrandimento fibrotico della maggior parte degli spazi portalì con occasionali ponti porto-portalì	3
Ingrandimento fibrotico della maggior parte degli spazi portalì con numerosi ponti sia porto-portalì sia porto-centralì	4
Numerosi ponti porto-portalì e porto-centralì con occasionali noduli	5
Cirrosi	6

Tabella III. *Staging* istologico secondo Ishak.

### Scheuer

Nel 1991 Scheuer propone un sistema di stadiazione pensato in origine per le epatiti virali croniche ma ora applicato anche alle forme non virali (Scheuer 1991).

Tale sistema è meno complesso dell'HAI, possiede la peculiarità di valutare separatamente la componente portale/periportale e quella lobulare delle lesioni necroinfiammatorie (Tabella IV) e valuta separatamente la fibrosi, attribuendole un punteggio da 0 a 4 (Tabella V).

Attività portale/periportale	Attività lobulare	Punteggio
Nessuna o minima	Nessuna	0
Infiammazione portale	Infiammazione, no necrosi	1
<i>Piecmeal necrosis</i> lieve	Necrosi focale o corpi acidofili	2
<i>Piecmeal necrosis</i> moderata	Danno cellulare focale, severo	3
<i>Piecmeal necrosis</i> severa	Danno parenchimale con necrosi a ponte	4

Tabella IV. *Grading* istologico di Scheuer.

CARATTERISTICHE ISTOLOGICHE	PUNTEGGIO
Assenza di fibrosi	0
Spazi portalari allargati per fibrosi	1
Setti portalari o porto-portalari con architettura intatta	2
Fibrosi con disturbo architetturale ma non ancora cirrosi	3
Cirrosi	4

Tabella V. *Staging* istologico di Scheuer.

### **Metavir**

Questo sistema classificativo è stato proposto dal gruppo di studio cooperativo francese METAVIR, prevedendo due punteggi separati per la valutazione dell'attività istologica e per lo stadio di fibrosi. Esso riflette la combinazione di necrosi lobulare, infiammazione portale, piecemeal necrosis e necrosi a ponte. L'attività va da A0 ad A3 (da assenza di attività ad attività severa). La fibrosi è classificata in quattro stadi (Tabella VI) (Bedossa 1996).

CARATTERISTICHE ISTOLOGICHE	PUNTEGGIO
Assenza di fibrosi	0
Fibrosi periportale	1
Setti porto-portalari (> 1 setto)	2
Setti porto-portalari	3
Cirrosi	4

Tabella VI. *Staging* istologico di METAVIR.

### **Confronto tra metodi semiquantitativi**

I diversi metodi semiquantitativi sono generalmente considerati poco sovrapponibili per la variabilità dei parametri considerati per definire sia il *grading* che lo *staging* della patologia epatica e per la dimostrata variabilità intra e inter-osservatore.



Un recente studio di confronto tra Ishak e METAVIR ha comunque dimostrato una concordanza quasi perfetta (weighted kappa 0,998) nella definizione dello stadio di fibrosi tra i due sistemi, che risultava però moderata (weighted kappa 0,627) nella valutazione dell'attività necro-infiammatoria probabilmente correlata all'impiego di parametri diversi nei due sistemi per definire il grading. Il sistema METAVIR, in particolare, non definisce il grado di infiammazione portale, per cui secondo gli autori di questo lavoro il sistema di Ishak sembra preferibile per un *grading* e uno *staging* più dettagliato dell'epatopatia cronica, in particolar modo negli stadi intermedi di malattia, in cui lo sviluppo della cirrosi non è ancora conclamato ma il grado di fibrosi è già significativo (Rozario 2003).

## ***METODI INVASIVI DI VALUTAZIONE DELLA FIBROSI EPATICA***

### **Biopsia epatica**

La biopsia epatica è stata per lungo tempo il “gold standard” per la diagnosi, la stadiazione e il follow up delle epatopatie e rappresenta attualmente il termine di confronto negli studi comparativi sull’efficienza diagnostica dei marcatori non invasivi di fibrosi.

Esistono due differenti tecniche per ottenere campioni di tessuto epatico, ossia la biopsia a cuneo (*wedge biopsy*) e la biopsia con ago (*needle biopsy*). La biopsia con ago percutanea è la tecnica più rapida, sicura e maggiormente impiegata per lo studio, il *grading* e lo *staging* delle epatopatie diffuse. Inoltre la maggior parte dei centri utilizza oggi la biopsia percutanea eco-assistita o eco-guidata per la notevole riduzione delle complicanze che ne derivano.

Le indicazioni alla biopsia epatica sono indicate nella tabella VII. Tale procedura risulta particolarmente utile per definire l’eziologia dell’epatopatia in assenza di esami sierologici suggestivi di una specifica patologia, per ottenere informazioni prognostiche sulla progressione della patologia, per determinare l’urgenza con cui intraprendere un trattamento antivirale, per escludere diagnosi alternative o patologie concomitanti, per definire la responsività al trattamento antivirale e infine per il *follow-up* dell’epatopatia mediante biopsie seriate (Bravo 2001).

INDICAZIONI ALLA BIOPSIA EPATICA
<i>Grading</i> e <i>staging</i> delle epatiti croniche virali (epatite B e epatite C)
Diagnosi, <i>grading</i> e <i>staging</i> dell’epatopatia alcolica, della steatoepatite non alcolica e dell’epatite autoimmune
Diagnosi di emocromatosi e valutazione quantitativa dell’accumulo di ferro al livello epatico
Diagnosi di Malattia di Wilson e valutazione quantitativa dell’accumulo di rame al livello epatico
Diagnosi, <i>grading</i> e <i>staging</i> di cirrosi biliare primitiva e colangite sclerosante primitiva
Valutazione delle cause di alterazioni di enzimi epatici (AST, ALT, $\gamma$ GT, ALP) di origine sconosciuta
Valutazione dell’efficacia o degli effetti collaterali di regimi terapeutici (es. terapia con metotrexate in pazienti affetti da psoriasi)
Determinazione dell’eziologia di lesioni focali epatiche
Valutazione del fegato trapiantato e del fegato donatore pre-trapianto

Tabella VII. Indicazioni alla biopsia epatica (Bravo 2001).

Le controindicazioni alla biopsia epatica sono relativamente scarse e sono indicate nella tabella VIII.

CONTROINDICAZIONI ALLA BIOPSIA EPATICA	
<b><i>CONTROINDICAZIONI ASSOLUTE</i></b>	
Paziente non cooperante	
Episodi anamnestici di sanguinamento	
Tempo di protrombina $\geq 3-5$ secondi rispetto al valore normale	
Piastrine $< 50000/\text{mm}^3$	
Tempo di sanguinamento $\geq 10$ minuti	
Uso di FANS nei precedenti 7-10 giorni	
Lesione sospetta per angioma o altra lesione vascolare	
Impossibilità di individuare il sito di accesso con tecnica d' <i>imaging</i>	
Sospetta echinococcosi epatica	
<b><i>CONTROINDICAZIONI RELATIVE</i></b>	
Obesità	
Ascite	
Emofilia	
Infezioni pleuriche o subfreniche destre	

Tabella VIII. Controindicazioni assolute e relative alla biopsia epatica (Bravo 2001).

Nonostante il fegato sia un organo molto vascolarizzato, le complicanze della biopsia epatica si verificano raramente. Il 60% delle complicanze si verifica entro 2 ore e il 96% entro 24 ore dalla procedura. Una percentuale di pazienti compresa tra l'1% e il 3% necessita del ricovero ospedaliero per complicanze derivanti dalla procedura stessa (Piccinino 1986). Tali considerazioni giustificano attualmente l'esecuzione della biopsia epatica in regime di *Day-Hospital*.

La biopsia epatica rimane comunque un esame strumentale invasivo e non privo di complicanze sia minori che maggiori. Le complicanze minori comprendono il dolore transitorio post-biopsia al livello dell'ipocondrio destro, avvertito dai pazienti in circa il 30% dei casi, e l'ipotensione transitoria conseguente ad una reazione vaso-vagale. Le complicanze maggiori comprendono emorragie intraperitoneali, ematomi sottocapsulari o intraparenchimali, emobilia,

puntura di altri visceri quali polmone, rene, colecisti e colon, peritonite biliare, pneumotorace, enfisema sottocutaneo, versamento pleurico, emotorace, sepsi o ascessi, rottura dell'ago (Bravo 2001). E' importante sottolineare che le complicanze maggiori, grazie al perfezionamento delle tecniche e degli strumenti nonché all'assistenza ecografica, si sono notevolmente ridotte nel tempo e attualmente oscillano tra lo 0.3% e lo 0.57% (Gunneson 2002). La mortalità in seguito alla procedura varia dallo 0,01% allo 0,17% ed è prevalentemente causata da emorragia in pazienti cirrotici o con lesioni primitive epatiche maligne (McGill 1990).

Un altro aspetto importante da considerare riguarda i costi di tale procedura diagnostica, è stato infatti calcolato che negli Stati Uniti il costo di una biopsia epatica sia di 1032 US\$ in assenza di complicazioni e di 2745 US\$ se le suddette complicazioni si verificano (Wong 2000).

Le principali limitazioni della biopsia epatica sono rappresentate dall'errore di campionamento e dalla variabilità di interpretazione osservatore dipendente.

L'errore di campionamento è strettamente correlato alla non uniforme distribuzione del danno epatico e coinvolge sia lo *staging*, generalmente inaccurato che il *grading* necroinfiammatorio, usualmente sottostimato. L'importanza degli errori di campionamento è stata recentemente sottolineata da uno studio condotto su biopsie epatiche ottenute tramite laparoscopia che evidenziava differenze eccedenti 1 punto di score di fibrosi secondo Scheuer tra lobo sinistro e lobo destro in circa un terzo dei casi (precisamente il 30,4%) e nel 14,5% dei casi la diagnosi di cirrosi veniva fatta in un lobo ma non nel contro-laterale (Regev 2002). Studi autoptici e laparoscopici di confronto indicano che la biopsia epatica sottostima la cirrosi nel 10-30% dei casi, a seconda del tipo di ago utilizzato e delle dimensioni del frustolo prelevato (Maharaj 1986, Poniachik 1996).

E' importante sottolineare che l'errore di campionamento si riduce in modo proporzionale all'incremento delle dimensioni del campione bioptico. Il valore diagnostico della biopsia epatica è infatti influenzato dalle caratteristiche del campione analizzato. Le dimensioni del campione bioptico, che variano tra 1 e 3 cm di lunghezza e 1.2 e 2 mm di diametro, corrispondono ad 1/50000 della massa epatica complessiva. Generalmente per una diagnosi accurata dell'epatopatia è necessario un frustolo della lunghezza di 1.5-2.5 cm e dello spessore di 1.2-2 mm (Poynard 2000). L'importanza delle dimensioni del campione è dimostrata dalla corretta diagnosi che, con i moderni sistemi a punteggio, è possibile nel 65% dei casi con campioni di 15 mm e nel 75% dei casi per frustoli di lunghezza superiore a 25 mm (Bedossa 2003). Il numero di spazi portali presenti nel campione è di fondamentale importanza, la maggior parte degli anatomopatologi considerano la

presenza di almeno 6-8 spazi portalì un risultato adeguato. Una recente revisione critica della letteratura sulla biopsia epatica nelle epatopatie virali stabilisce che il campione bioptico dovrebbe contenere almeno 11 spazi portalì completi ed essere lungo almeno 20 mm per avere un'affidabilità diagnostica adeguata (Guido 2004).

La variabilità di interpretazione osservatore dipendente è un altro potenziale limite della biopsia epatica. L'impiego di sistemi classificativi standardizzati ha cercato di limitare questo problema, garantendo un accordo inter-osservatore in una percentuale variabile dal 70 al 90% e un accordo intra-osservatore in una percentuale variabile dal 60 al 90% dei campioni bioptici analizzati (Bedossa 1994). La discrepanza inter-osservatore è minima nel valutare la presenza di cirrosi, moderata nel valutare stadi intermedi di fibrosi e particolarmente alta nella valutazione dell'attività infiammatoria. Infatti la riproducibilità degli score di infiammazione è molto più bassa rispetto alla riproducibilità degli stadi di fibrosi (Goldin 1996, Westin 1999).

Nell'ultimo decennio partendo dalla considerazione che la fibrogenesi epatica è un processo dinamico e che la biopsia epatica è una procedura non priva di limitazioni, sono stati proposti numerosi marcatori sierologici e strumenti diagnostici non invasivi in grado di valutare la fibrosi epatica in modo accurato, riproducibile, ripetibile e facilmente eseguibile.

## ***METODI NON INVASIVI DI VALUTAZIONE DELLA FIBROSI EPATICA***

### ***Il marcatore non invasivo ideale di fibrosi epatica***

Il marcatore non invasivo ideale dovrebbe fornire una stima accurata della fibrosi epatica e al tempo stesso essere sensibile a cambiamenti della fibrosi indotti dalla naturale progressione dell'epatopatia o dalla terapia antivirale. Le caratteristiche di un tale marcatore ideale dovrebbero essere le seguenti:

- Elevata specificità per la fibrosi epatica
- Elevata sensibilità per la fibrosi epatica
- Capacità di fornire informazioni sullo stadio di fibrosi e sulla fibrogenesi
- Indipendenza da alterazioni metaboliche
- Semplicità di esecuzione
- Indipendenza da comorbidità
- Accurata caratterizzazione dell'emivita e della via di escrezione
- Capacità di fornire informazioni su differenti stadi di fibrosi e di differenziare la cirrosi dagli altri stadi di fibrosi
- Elevata riproducibilità

I marcatori di fibrosi sono divisi in due gruppi principali: indiretti e diretti.

I marcatori indiretti riflettono alterazioni della funzionalità epatica indotte dalla fibrosi, i marcatori diretti invece riflettono i cambiamenti indotti sulla matrice extracellulare dalla fibrogenesi (Pinzani 2005).

### **Marcatori indiretti di fibrosi epatica**

I marcatori indiretti di fibrosi epatica riflettono alterazioni della funzionalità epatica indotte dalla fibrosi, i più utilizzati sono elencati di seguito.

#### **Rapporto GOT/GPT (AST/ALT RATIO):**

GOT e GPT vengono rilasciate dagli epatociti in presenza di danno epatico e rappresentano un buon indice dell'attività della malattia, ma la loro attività non è strettamente legata alla fibrosi. Pertanto, utilizzate singolarmente, non sono clinicamente utili perché troppo aspecifiche (Anderson 2000). I livelli di GOT rispetto ai valori di GPT tendono invece a crescere in modo progressivo al progredire della fibrosi epatica. Numerosi studi hanno evidenziato una correlazione diretta tra rapporto GOT/GPT superiore a 1 e presenza di cirrosi epatica. La sensibilità e la specificità di tale rapporto per la diagnosi di cirrosi variano a seconda degli studi considerati, riportando valori di sensibilità compresi tra il 47% (Pohl 2001) e il 78% (Giannini 2003) e valori di specificità compresi tra il 90% e il 97% (Imperiale 2000, Giannini 2003, Pohl 2001). E' importante sottolineare che il rapporto GOT/GPT può essere alterato in presenza di abuso alcolico (Oberti 1997).

#### **Conta piastrinica**

La correlazione inversa tra conta piastrinica e stadio di fibrosi epatica nell'epatite C cronica è stata dimostrata in diversi studi ma pochi hanno stabilito il valore diagnostico di tale parametro. La sensibilità e la specificità per diagnosi di cirrosi sono del 91% e dell'88% rispettivamente prendendo come livello di cut-off una conta inferiore a 130000/ $\mu$ L (Giannini 2003).

#### **Tempo di protrombina (PT):**

E' un indice precoce di fibrosi epatica ed è inoltre correlato alla funzione di sintesi epatica. Valori di PT  $\geq 100\%$  e  $\geq 105\%$  escludono rispettivamente una diagnosi di cirrosi e di fibrosi severa, mentre valori  $\leq 70\%$  e  $\leq 80\%$  depongono per presenza di cirrosi e fibrosi severa (Croquet 2002).

#### **APRI (AST/Platelet Ratio Index):**

L'indice APRI è il rapporto tra GOT e piastrine ottenuto impiegando la seguente formula:

$$APRI = \text{GOT (UI/L)} \times 100 / \text{piastrine (10}^9\text{/L)}.$$

La progressione della fibrosi e l'incremento della pressione portale determinano una riduzione della produzione di trombopoietina e un incremento del sequestro di piastrine al livello

splenico (Kawasaki 1999, Aster 1966). La fibrosi avanzata si associa inoltre ad una ridotta *clearance* di AST (Kamimoto 1985). L'indice APRI è pertanto in grado potenzialmente di distinguere l'assenza e la presenza di fibrosi significativa e/o cirrosi. Gli studi che prevedevano l'impiego di tale indice sono stati condotti prevalentemente in pazienti con epatite C cronica, con infezione HIV/HCV e con epatopatia alcolica. Il primo studio retrospettivo che valutava l'impiego dell'indice APRI ha dimostrato che è un test semplice ed accurato per la valutazione della fibrosi significativa e della cirrosi epatica con un'area sottesa dalla curva ROC (*Receiving Operator Curve*) pari a 0.88 e a 0.94 rispettivamente, con una sensibilità dell'89% e specificità del 75% (Wai 2003). Il maggiore vantaggio di tale test è la sua semplicità poiché usa due parametri di laboratorio analizzati di routine. In una recente meta-analisi che includeva 22 studi, prevalentemente condotti in pazienti con epatite C cronica, è stato dimostrato che considerando un valore soglia di 0.5 la sensibilità e la specificità di tale test nell'individuare la fibrosi severa sono rispettivamente dell'81% e del 50%, impiegando invece un valore soglia di 1 la sensibilità e la specificità di tale test nell'individuare la cirrosi sono rispettivamente del 76% e del 71%. Gli autori concludono pertanto che il test APRI è particolarmente utile nell'escludere la presenza di fibrosi severa (Shaheen 2007).

#### PGA INDEX:

Tale indice combina la misurazione del tempo di protrombina, gamma-glutamyl transferasi ( $\gamma$ GT) e apolipoproteina A1. E' stato validato in pazienti con epatopatia cronica di diversa eziologia e in modo particolare nei pazienti con epatopatia alcolica. La sua accuratezza nella diagnosi di cirrosi varia dal 66% al 72% a seconda degli studi considerati (Poynard 1991, Teare 1993).

#### PGAA INDEX:

E' la forma modificata del PGA index e prevede l'aggiunta del valore dell' $\alpha$ 2-macroglobulina che comporta un miglioramento della sua performance. La sua accuratezza diagnostica nella diagnosi di cirrosi risulta dell'80%, la sua sensibilità e specificità sono risultate pari al 79% e all'89% rispettivamente. La sua performance sembra essere migliore nei confronti delle epatopatie alcoliche rispetto a quelle di origine virale (Kage 1997).

#### FIBROTEST:

E' un indice costituito da un pannello di cinque markers biochimici, precisamente  $\alpha$ 2-macroglobulina, aptoglobina, apolipoproteina A1, gamma-GT e bilirubina totale, aggiustati per fattori epidemiologici quali età e sesso. I risultati di tale test permettono di individuare tre categorie di fibrosi: 1) minima (METAVIR F0-F1) 2) severa (METAVIR F2-F4) 3) indeterminata. Nel primo



studio che prevedeva l'impiego di tale test in circa 350 pazienti con epatite C cronica la sensibilità e la specificità nell'individuare la fibrosi severa sono risultate del 75% e dell'85% rispettivamente. Il test permetteva di identificare correttamente la presenza di fibrosi minima o severa nel 46% dei pazienti esaminati (Imbert-Bismut 2001). Tale test è stato successivamente validato in diverse coorti di pazienti con epatite C cronica ottenendo risultati talora contrastanti (Myers 2003, Myers 2003, Rossi 2003). Un recente studio indipendente condotto da Rossi e collaboratori su una coorte di 125 pazienti con epatite C cronica ha dimostrato che il fibrotest non è in grado di individuare correttamente la presenza o assenza di fibrosi, è importante sottolineare che nel suddetto studio i parametri di laboratorio sono stati valutati localmente ed è stato utilizzato il programma computerizzato degli autori dello studio per calcolare il punteggio del fibrotest. In ogni caso una recente meta-analisi ha stabilito che il fibrotest è uno strumento efficiente per la valutazione della fibrosi nei pazienti con epatite C cronica, epatite B cronica, epatopatia alcolica e steatosi epatica, essendo una valida alternativa alla biopsia epatica (Poynard 2007). I dati disponibili suggeriscono pertanto che il fibrotest abbia una buona efficienza nella diagnosi dei due estremi degli stadi di fibrosi epatica (F0-F1 e F4), decisamente inferiore per i suoi stadi intermedi.

#### ACTITEST:

E' una variante del Fibrotest che prevede l'inclusione dei livelli di GPT tra i parametri da valutare, riflettendo sia il livello di fibrosi epatica che quello di infiammazione e necrosi. Questa piccola modifica conferisce al test un più elevato valore diagnostico nell'identificazione della fibrosi epatica severa, in particolar modo in presenza di una maggiore attività istologica (Halfon 2002).

Numerosi studi hanno dimostrato una riduzione del punteggio sia del Fibrotest che dell'Actitest nei pazienti con epatite C cronica e risposta virologica sostenuta al trattamento antivirale, supportando il concetto che tali test possano essere utili non solo nello *staging* iniziale dell'epatopatia ma soprattutto nel monitoraggio della risposta istologica al trattamento antivirale (Poynard 2002, Poynard 2003).

Attualmente si ritiene che sia il Fibrotest che l'Actitest abbiano un valore diagnostico superiore rispetto a molti altri indici, pur non essendo ancora sufficientemente accurati per poter sostituire la biopsia epatica soprattutto a causa della presenza di falsi-positivi e negativi derivanti dall'alterazione fegato indipendente dei valori sierici di bilirubina, aptoglobina e proteine di fase acuta ad esempio in corso di emolisi acuta, epatite acuta, infiammazione acuta e colestasi extra-epatica (Blanc 2005).

### FORNS'INDEX:

E' un indice basato sulla valutazione di quattro parametri di routine (età, conta piastrinica, colesterolo e  $\gamma$ GT) elaborati impiegando la seguente equazione:

$$\text{Forns'index} = 7.811 - 3.131 \times \ln(\text{piastrine}) + 0.781 \times \ln(\gamma\text{GT}) + 3.467 \times \ln(\text{età}) - 0.014 \times \text{colesterolo}.$$

Il più importante studio disegnato per valutare l'accuratezza diagnostica di questo test è stato condotto su una coorte di 250 pazienti con epatite C cronica. Sono stati pertanto identificati i valori di cut-off in grado definire la presenza o assenza di fibrosi che erano 6.9 e 4.2 rispettivamente e sono state definite la sensibilità e la specificità del test nell'individuare la presenza di fibrosi severa, 30% e 95% rispettivamente, e l'assenza di fibrosi severa, 94% e 51% rispettivamente. Il Forns'index è in grado di escludere la presenza di fibrosi severa con un valore predittivo negativo pari al 96% e di identificare la presenza di fibrosi severa con un valore predittivo positivo pari solamente al 66% (Forns 2002). E' pertanto un test utile nell'identificare pazienti con fibrosi minima ma di limitato valore nell'identificare pazienti con patologia epatica più avanzata. Tra le maggiori critiche fatte a questo test ricordiamo il fatto di lasciare almeno un 50% di pazienti non classificati e che l'impatto dell'epatopatia sull'assetto lipidico e l'effetto dei farmaci ipolipemizzanti possono entrambi compromettere il risultato del test (Manning 2008).

### FIBROINDEX:

Questo indice è calcolato impiegando due parametri, ossia la conta piastrinica e i livelli di  $\gamma$ GT. I risultati inerenti la sua accuratezza diagnostica sono ancora preliminari e sembra utile nel monitoraggio della progressione della fibrosi epatica e nel valutare l'effetto del trattamento antivirale sulla fibrosi epatica nei pazienti con epatite C cronica (Koda 2007).

### FIB-4:

Questo test combina alcuni parametri biochimici (conta piastrinica, ALT, AST) con l'età. Nei due studi condotti per validarne l'impiego ha dimostrato una buona accuratezza diagnostica nella diagnosi di fibrosi severa in pazienti con epatite C cronica. L'area sottesa dalla curva ROC di tale test per la diagnosi di fibrosi severa è pari a 0.85 e per la diagnosi di cirrosi è pari a 0.91 (Vallet-Pichard 2007, Sterling 2006).

### **Marcatori diretti di fibrosi epatica**

I marcatori diretti di fibrosi comprendono una serie di markers sierici o urinari che sono direttamente coinvolti nella deposizione o nella rimozione di matrice extracellulare (ECM). Dal momento che il turn-over della matrice è correlato sia alla deposizione di nuova ECM che alla rimozione e al suo rimodellamento, i markers diretti di fibrosi dovrebbero teoricamente subire sia cambiamenti qualitativi che quantitativi durante i suddetti processi. E' stato infatti dimostrato che i loro livelli sono spesso elevati in condizioni di rapida progressione verso la fibrosi prima della deposizione di quantità significative di ECM (Pares 1996, Ramadori 1991) e tendono a cadere in risposta al trattamento della patologia sottostante, spesso prima della riduzione visibile dello stadio di fibrosi (Niemela 1990, Camps 1994). Tali marcatori potrebbero pertanto essere potenzialmente utilizzati non solo per studiare la fibrosi epatica ma anche e soprattutto per determinare la velocità della fibrogenesi, fornendo pertanto importanti implicazioni prognostiche e terapeutiche.

Possiamo classificarli in base al rapporto con il metabolismo della matrice:

- marcatori che riflettono la deposizione di matrice (procollagene I e III, tenascina, inibitori delle metallo-proteinasi o TIMP, TGF- $\beta$ )
- marcatori che riflettono la rimozione di matrice (procollagene e collagene IV, metallo-proteinasi o MMP)
- marcatori per i quali la relazione con la deposizione piuttosto che con la rimozione di matrice non è completamente chiara (ialuronato, laminina, YKL- 40).

Oppure possiamo classificarli in base alla struttura molecolare:

- collageni (procollagene I e III, rilasciati nel siero durante la deposizione e il rimodellamento della matrice extracellulare, collagene IV, rilasciato durante la degradazione e il rimodellamento della matrice extracellulare)
- glicoproteine e polisaccaridi (acido ialuronico, laminina, tenascina, YKL-40)
- collagenasi e loro inibitori (metallo-proteinasi o MMP e loro inibitori o TIMP)
- citochine coinvolte nella fibrosi (TGF- $\beta$ , PDGF e IL-10).

I limiti di impiego clinico di questi marcatori consistono nel fatto di non essere disponibili in tutti i centri e di non essere specifici del fegato, potendo potenzialmente correlare con processi fibrogenici che avvengono in altri organi, inoltre la loro concentrazione sierica o urinaria è strettamente correlata all'escrezione renale e al metabolismo epatico.

### Acido Ialuronico (HA)

L'acido ialuronico è un glicosaminoglicano sintetizzato dalle cellule stellate epatiche e degradato dalle cellule sinusoidali epatiche ed è un componente della matrice extracellulare (McGary 1989). Nei pazienti con epatopatie croniche, in particolar modo nei cirrotici, è indice di alterato funzionamento delle cellule sinusoidali epatiche e riflette un incremento del processo fibrogenico (Guechot 1996). Tra i marcatori sierici diretti di fibrosi che riflettono la concentrazione di matrice extracellulare considerati singolarmente l'HA sembra possedere la migliore accuratezza diagnostica. Numerosi studi hanno evidenziato una buona correlazione tra concentrazione sierica di HA e stadio di fibrosi epatica sia in pazienti con epatite C cronica che in pazienti con epatopatia alcolica (Guechot 1996, Murawaki 2001, Pares 1996). L'acido ialuronico è incluso in numerosi score per la valutazione della fibrosi epatica quali l'indice SHASTA, l'Hepascore e il FibroSpect score.

### PIIINP

Il PIIINP è il marcatore di fibrosi epatica maggiormente studiato. I suoi livelli risultano elevati durante l'epatite acuta e correlano con i livelli di transaminasi (Trinchet 1991). Nei pazienti con epatite C cronica i livelli di PIIINP correlano con il grado di necroinfiammazione epatica più che con lo stadio di fibrosi (Giannini 2001, Gabrielli 1997).

### Laminina

La laminina è una glicoproteina sintetizzata dalle cellule stellate epatiche. In presenza di uno stomolo lesivo epatico la laminina viene depositata attorno ai sinusoidi epatici e al livello degli spazi portal. I livelli sierici di laminina e del suo frammento P1 sono elevati nei pazienti con epatiti virali croniche e con epatopatia alcolica (Walsh 2000).

### Metallo-proteinasi (MMP) e Inibitori delle metallo-proteinasi (TIMP)

Le metallo-proteinasi e i loro inibitori, gli inibitori tissutali delle metallo-proteinasi, sono un gruppo di proteine coinvolte nel controllo della matrice extracellulare (Benyon 2001, Arthur 2000).

L'interazione tra metallo-proteinasi e loro inibitori è complessa e regola numerosi processi quali l'attivazione di fattori di crescita, la proliferazione cellulare e l'inibizione dell'apoptosi.

MMP2 o gelatinasi-A è prodotta dalle cellule stellate epatiche attivate e i suoi livelli aumentano in presenza di collagene di tipo I. Gli studi che hanno correlato i livelli circolanti di questa metallo-proteinasi con lo stadio di fibrosi epatica in pazienti con epatite C cronica hanno fornito risultati contrastanti (Walsh 1999, Boeker 2002). Sia MMP-3 (stromelisin) che MMP-9 (gelatinasi-B) sembrano avere uno scarso valore diagnostico (Murawaki 1999, Hayasaka 1996).

I livelli di TIMP-1 sembrano invece possedere una sensibilità pari al 100% e una specificità compresa tra il 56% e il 75% per la diagnosi di cirrosi epatica nei pazienti con epatite C cronica, fornendo risultati promettenti (Larrousse 2007).

#### YKL-40

YKL-40 è un nuovo marcatore di fibrosi epatica. E' una proteina di 39 kilodalton che funge da fattore di crescita per i fibroblasti, i condrociti e le cellule sinoviali, inoltre funge da fattore di migrazione per le cellule endoteliali. Studi di immunoistochimica hanno dimostrato la presenza di tale fattore nelle aree di fibrosi epatica e fibrogenesi (Johansen 2000). Il suo impiego è stato studiato nei pazienti con epatopatia alcolica (Nojgaard 2003) e nei pazienti con schistosomiasi epatica (Zheng 2005).

#### Citochine

Un elevato numero di citochine coinvolte nei processi fibrogenici sono state studiate come potenziali marcatori di fibrosi epatica. Sia il TGF- $\beta$  che il TNF- $\alpha$  sembrano fornire risultati promettenti (Nelson 1997, McClain 1989).

Recentemente è aumentato l'interesse nei confronti dell'uso che si può fare di tali marcatori nel valutare l'effetto del trattamento antivirale sulla fibrosi epatica e nel monitoraggio della progressione della fibrosi stessa. Molti studi hanno impiegato i suddetti marcatori per valutare l'effetto della terapia con interferone, dimostrando che i livelli sierici di acido ialuronico, PIIINP, YKL-40 e TIMP1 si riducono nei pazienti che ottengono una risposta biochimica e virologica sostenuta in seguito al trattamento antivirale, al contrario in presenza di recidiva essi tendono a ritornare ai livelli pretrattamento. Particolarmente promettente in questo senso è risultato l'impiego dell'acido ialuronico e di PIIINP.

## Associazione di marcatori indiretti e diretti di fibrosi epatica

### HEPAScore

L'Hepascore combina i seguenti parametri clinici e di laboratorio: età, sesso, bilirubina,  $\gamma$ GT, acido ialuronico (HA),  $\alpha$ 2-macroglobulina al fine di fornire un punteggio indicativo dello stadio di fibrosi. Uno studio condotto su 104 pazienti con epatite C cronica ha confrontato l'accuratezza diagnostica di questo score rispetto all'APRI e al Forns'Index, determinando aree sottese dalle curve ROC pari a 0.82, 0.90 e 0.89 per la diagnosi di fibrosi significativa, fibrosi severa e cirrosi rispettivamente (Adams 2005).

### SHASTA Index

Questo indice include i seguenti parametri: acido ialuronico (HA), AST e albumina. E' stato validato in pazienti con coinfezione HIV/HCV dimostrando un'accuratezza diagnostica simile a quella del FibroTest (Kelleher 2005).

### FibroSpect

Questo test combina i seguenti parametri: acido ialuronico (HA), inibitore delle metallo-proteinasi 1 (TIMP 1) e  $\alpha$ 2-macroglobulina. Gli studi disegnati per validare questo test hanno dimostrato una buona accuratezza diagnostica nell'identificare la presenza di fibrosi severa o cirrosi e nell'identificare la presenza di fibrosi minima, non risultando ugualmente accurato nella definizione degli stadi intermedi di fibrosi (Zazam 2007, Christensen 2006).

### ELF

Il gruppo di studio Europeo sulla fibrosi epatica ha recentemente validato un algoritmo comprendente età, acido ialuronico (HA), PIIINP e TIMP-I per la stadiazione della fibrosi epatica in pazienti con epatite C cronica, epatopatia alcolica e NAFLD (*non alcoholic fatty liver disease*). Tale algoritmo è stato in grado di predire la presenza di fibrosi con una sensibilità del 90% e l'assenza di fibrosi con un valore predittivo negativo del 92% (Rosenberg 2004).

La performance diagnostica dei marcatori sierici diretti e indiretti di fibrosi epatica nella diagnosi di fibrosi severa e cirrosi in pazienti con epatiti virali è riportata nelle tabelle IX e X, rispettivamente (Castera 2009).

Markers	Eziologie	SF (%)	Cut-offs	AUROC	Se (%)	Sp (%)
<b>Fibrotest</b> <i>Imbert-Bismut 2001</i>	HCV	38	>0.48	0.78	68	81
<b>Forns Index</b> <i>Forns 2002</i>	HCV	26	>6.9	0.86	94	95
<b>APRI</b> <i>Wai 2003</i>	HCV	50	>1.5	0.88	91	95
<b>FibroSpect</b> <i>Patel 2004</i>	HCV	52	$\geq 42$	0.83	77	73
<b>MP3</b> <i>Leroy 2004</i>	HCV	45	> 0.4	0.82	65	85
<b>ELF</b> <i>Rosemberg 2004</i>	CLD	40	>0.102	0.77	95	99
<b>FPI</b> <i>Sud 2004</i>	HCV	48	$\geq 0.8$	0.77	85	98
<b>Hepascore</b> <i>Adams 2005</i>	HCV	57	$\geq 0.5$	0.82	63	89
<b>Fibrometer</b> <i>Cales 2005</i>	CLD	56	NA	0.89	80	84
<b>ViraHep-C</b> <i>Fontana 2006</i>	HCV	37	> 0.55	0.83	90	90
<b>Fibroindex</b> <i>Koda 2007</i>	HCV	50	$\geq 2.25$	0.86	36	97
<b>SHASTA</b> <i>Kellher 2005</i>	HCV-HIV	27	> 0.8	0.87	88	100

Tabella IX. Performance diagnostica dei marcatori non invasivi di fibrosi epatica nella diagnosi di fibrosi significativa ( $F \geq 2$ ) nei pazienti con epatiti virali croniche (modificato da Castera 2009). [SF, fibrosi significativa; AUROC, area sottesa dalla curva ROC; Se, sensibilità; Sp, specificità; NA, non valutato].

Markers	Eziologie	C (%)	Cut-offs	AUROC	Se (%)	Sp (%)
Fibrotest <i>Imbert- Bismut 2001</i>	HCV	12	$\geq 0.75$	0.87	50	98
APRI <i>Wai 2003</i>	HCV	17	$\geq 2.0$	0.94	89	93
Lok Index <i>Lok 2005</i>	HCV	38	$\geq 0.5$	0.81	98	99
Glycocirrottest <i>Callewaert 2004</i>	CLD	45	NA	0.87	79	86
Hepascore <i>Adams 2005</i>	HCV	16	$>0.84$	0.89	71	89
GUCI <i>Islam 2005</i>	HCV	12	$>1.0$	0.85	80	78
FIB-4 <i>Sterling 2006</i>	HCV-HIV	22	$> 3.25$	0.76	70	97

Tabella X. Performance diagnostica dei marcatori non invasivi di fibrosi epatica nella diagnosi di cirrosi nei pazienti con epatiti virali croniche (modificato da Castera 2009). [C, cirrosi epatica; AUROC, area sottesa dalla curva ROC; Se, sensibilità; Sp, specificità; NA, non valutato].

In conclusione nessun parametro non invasivo disponibile al momento è universalmente accettato come sostitutivo della biopsia epatica, in ogni caso l'impiego di tali marcatori permette di escludere o identificare correttamente la presenza di fibrosi epatica in circa il 35% dei pazienti esaminati che pertanto possono non essere sottoposti a biopsia epatica. Tali marcatori non permettono comunque di definire in modo accurato gli stadi intermedi di fibrosi (Figura III).

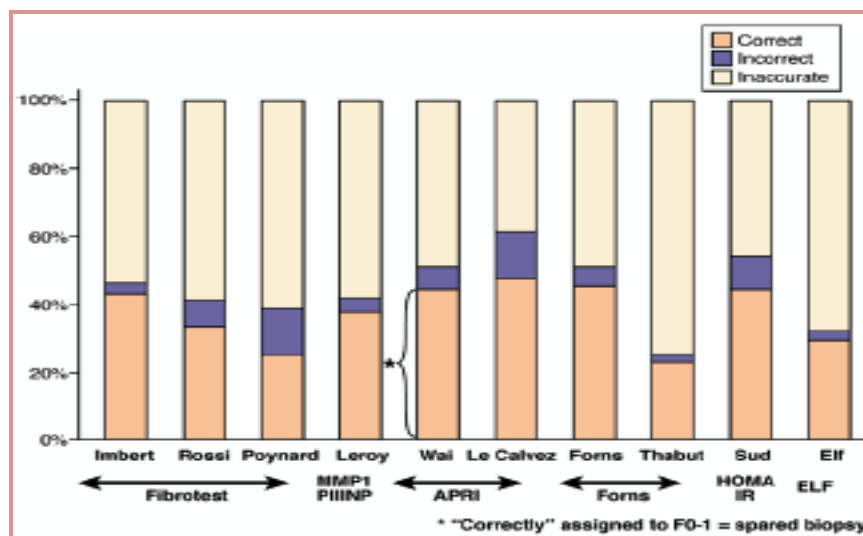


Figura III. Performance diagnostica di alcuni marcatori non invasivi di fibrosi epatica nel differenziare F0-1 da F2-4 (Manning 2008).



### **ELASTOMETRIA EPATICA AD IMPULSI (FIBROSCAN)**

L'elastometria epatica ad impulsi (FibroScan, *Echosens, Parigi, Francia*) è una metodica non invasiva che valuta la rigidità del fegato, indice indiretto della fibrosi epatica, mediante la tecnica di elastografia ad impulsi.

#### **PRINCIPI**

L'apparecchio è costituito da una sonda ecografica modificata, da un sistema elettronico dedicato e da una unità di controllo. La sonda contiene un vibratore, che genera onde elastiche di media amplitudine e bassa frequenza, e un trasduttore ecografico da 5 MHz utilizzato sia come emittente che come ricevente di ultrasuoni (Figura IV).

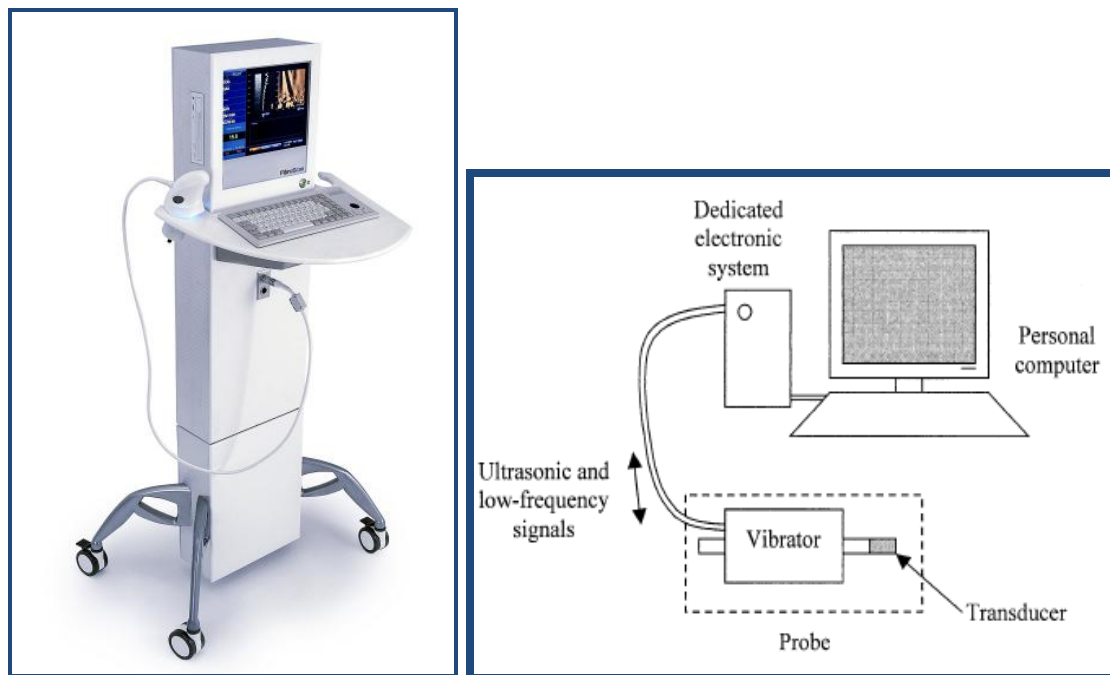


Figura IV. FibroScan e suoi componenti.

Le vibrazioni sono trasmesse dal vibratore al tessuto epatico attraverso il trasduttore, inducendo un'onda elastica che si propaga attraverso il tessuto. Contemporaneamente il trasduttore permette di registrare la propagazione dell'onda elastica e di misurarne la velocità, direttamente correlata all'elasticità del tessuto epatico grazie all'equazione:  $E = 3pV^2$ , dove  $E$  rappresenta l'elasticità,  $p$  la densità, che è una costante per un determinato tessuto e che per il fegato ha un valore unitario,  $V$  la velocità di propagazione dell'onda. Maggiore è la velocità di propagazione dell'onda elastica, maggiore è la rigidità del tessuto esaminato (figura V).

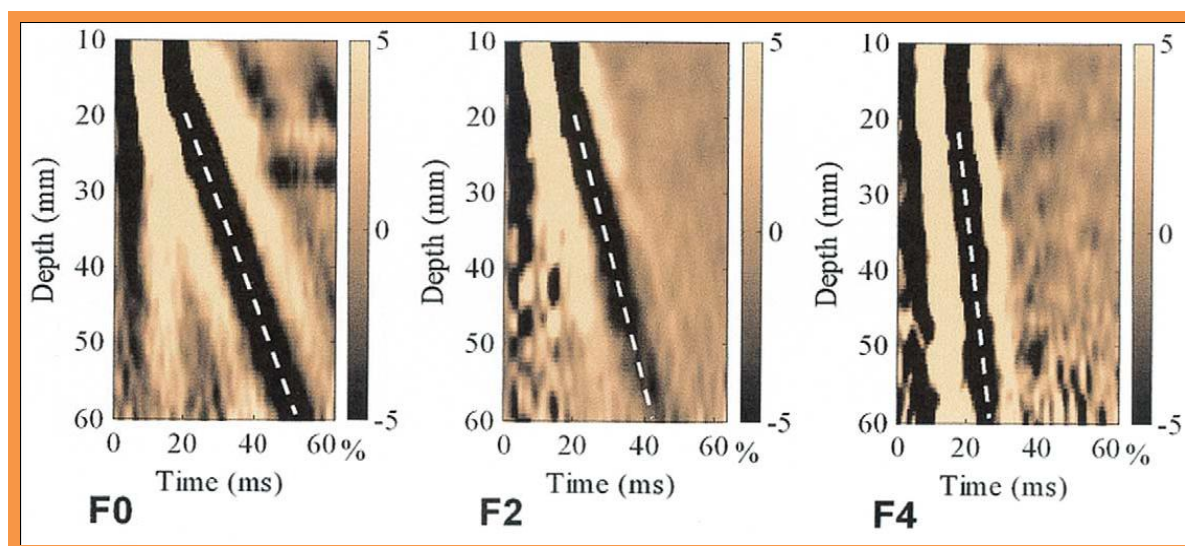


Figura V. Elastogrammi rappresentativi della diversa velocità di propagazione dell'onda elastica nel tessuto epatico a seconda dello stadio di fibrosi (Sandrin 2003).

Il Fibroscan valuta pertanto la fibrosi epatica misurando la rigidità del fegato, che viene espressa in kilopascal (kPa). I valori di elasticità epatica variano da 2,5 a 75 kPa, che corrispondono ad una velocità di propagazione che varia da 1 a 5 m/sec (Sandrin 2003).

#### MODALITA' DI ESECUZIONE

Le misurazioni vengono effettuate al livello del lobo epatico di destra, attraverso gli spazi intercostali, mentre il paziente giace in decubito dorsale con il braccio destro in massima abduzione (Figura VI). L'estremità della sonda viene ricoperta con il gel e localizzata sulla cute al livello degli spazi intercostali corrispondenti al lobo destro del fegato. L'operatore, osservando sul monitor le immagini ultrasonografiche bidimensionali del fegato, individua una porzione di parenchima epatico estesa per una profondità di almeno 6 cm, libera da grosse strutture vascolari. Una volta localizzata l'area da esaminare, l'operatore preme il pulsante posto sulla sonda per iniziare l'esame. Il sistema è tarato in modo da rifiutare automaticamente le stime di elasticità in cui la propagazione dell'onda non è misurata in modo appropriato, infatti soltanto le onde la cui velocità di propagazione è costante sono validate (Ledingham 2008).

L'elastometria epatica è un esame indolore per il paziente, facile e veloce da eseguire (richiede circa cinque minuti di tempo). Il paziente non deve necessariamente essere digiuno. Il risultato dell'esame è disponibile immediatamente. Il dispositivo misura la rigidità di una sezione cilindrica di tessuto epatico di 4 cm di lunghezza e di 1 cm di diametro che si trova ad una profondità di 2,5 cm al di sotto della superficie cutanea. Queste dimensioni sono circa 100 volte

maggiori di un campione biotico standard, dunque più rappresentative dell'intero parenchima epatico, consentendo di ridurre l'errore di campionamento.



Figura VI. Modalità di esecuzione dell'elastometria epatica (Ledinghen 2008).

### INTERPRETAZIONE DEL RISULTATO

La rigidità epatica o “*liver stiffness*” è la mediana di dieci misurazioni valide.

La percentuale di successo o “*success rate*” è il rapporto tra il numero di misurazioni valide e il numero di misurazioni totali ottenute durante l'esame.

L'IQR o “*interquartile range*” è la variabilità delle misurazioni effettuate.

La validità di una misurazione di “*stiffness*” epatica dipende da due parametri: l'IQR che non deve essere superiore al 20-30% del valore mediano di “*liver stiffness*” (Lucidarme 2009) e la

“*success rate*” che dovrebbe essere almeno del 60% (figura VII).

Gli studi condotti su soggetti sani hanno individuato valori di “*stiffness*” epatica compresi tra 4.8 kPa e 5.5 kPa, che pertanto vengono attualmente considerati i cut-off di normalità (Corpechot 2006, Roulot 2008).

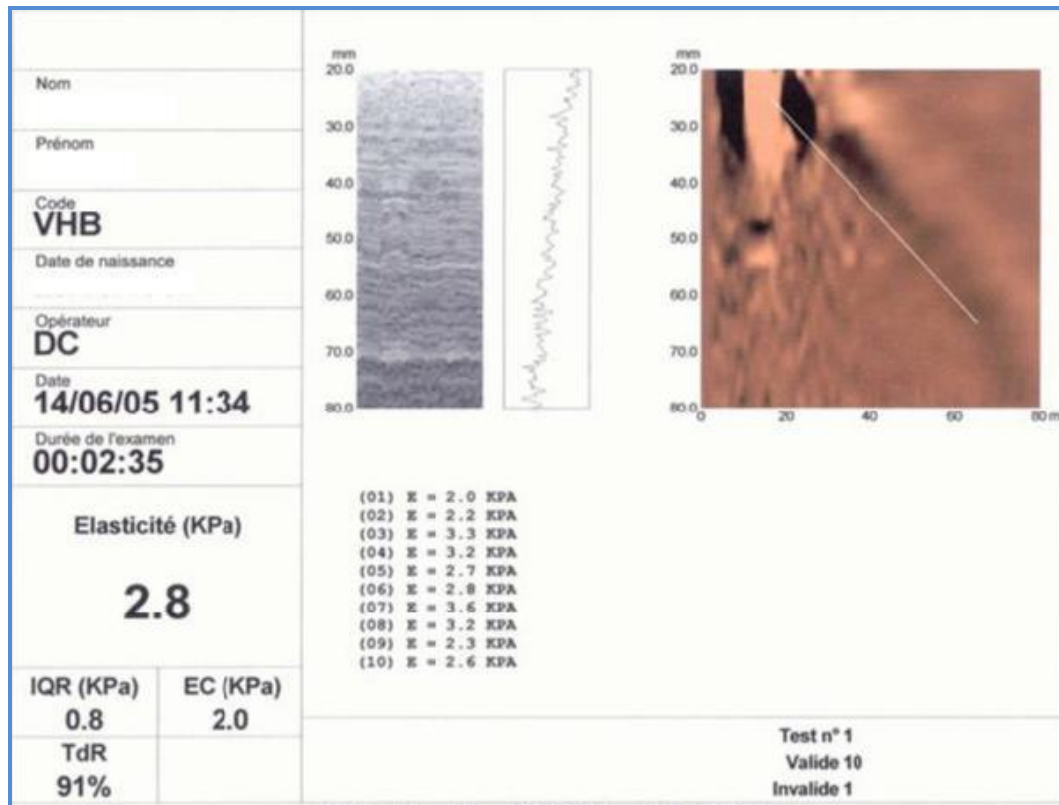


Figura VII. Risultato dell'elastometria epatica (FibroScan).

### RIPRODUCIBILITA'

La riproducibilità è un prerequisito di fondamentale importanza per l'introduzione di una nuova metodica diagnostica nella pratica clinica.

La riproducibilità dell'elastometria epatica ad impulsi è stata valutata in un ampio studio condotto da Fraquelli e colleghi su 195 individui affetti da epatopatie di diversa eziologia (prevalentemente epatite C cronica). I risultati ottenuti da due operatori diversi hanno evidenziato un elevato grado di concordanza inter-operatore, con un coefficiente di correlazione intra-classe (ICC) di 0.98. Il livello di concordanza era ridotto in presenza di sovrappeso (ICC 0.94 per BMI  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup> vs ICC 0.98 per BMI  $\leq 25$ ), di evidenza istologica o ecografica di steatosi epatica (ICC 0.90 per steatosi  $\geq 25\%$  degli epatociti vs ICC 0.98 per steatosi  $\leq 25\%$  degli epatociti) e soprattutto nella definizione degli stadi intermedi di fibrosi epatica (ICC 0.6 per METAVIR F0-F1 vs ICC 0.99 per F  $\geq 2$ ) (Fraquelli 2007). Un recente studio condotto in Francia ha ottenuto risultati simili, evidenziando un incremento della variabilità inter-osservatore per valori di “*stiffness*” epatica inferiori a 9 kPa (Boursier 2008).

### LIMITAZIONI

I risultati dell'elastometria epatica ad impulsi possono essere influenzati da fattori differenti rispetto alla fibrosi epatica.

Nei pazienti con epatiti virali croniche l'associazione tra il grado istologico di attività necroinfiammatoria epatica e il risultato dell'elastometria epatica è un argomento tuttora controverso, alcuni studi riportano un incremento parallelo dei valori di "*liver stiffness*" e del grado di attività istologica (Fraquelli 2007, Arena 2008, Vispo 2009), mentre altri non evidenziano questa associazione (Ziol 2005, Castera 2005). In ogni caso il rischio di sovrastimare la rigidità epatica è stato dimostrato durante i flares di transaminasi nei pazienti con epatite B cronica (Coco 2007, Olivieri 2008) e nei pazienti con epatiti virali acute (Arena 2008, Sagir 2008).

L'influenza della steatosi epatica sulle misurazioni elastometriche rimane un argomento dibattuto. Il grado di steatosi non sembra essere un fattore confondente, anche in seguito alla correzione effettuata per lo stadio di fibrosi (Sandrin 2003, Ziol 2005, Arena 2008). E' importante comunque sottolineare che negli studi citati la proporzione di pazienti con steatosi severa (> 60%) era troppo bassa per rispondere in modo adeguato a questo quesito. Ulteriori studi sono pertanto necessari per definire questo aspetto.

Infine l'esecuzione dell'esame è difficoltosa nei pazienti obesi o con spazi intercostali stretti ed è impossibile nei pazienti con ascite. In media la misurazione elastometrica non può essere effettuata nel 4.5% dei pazienti e l'unico fattore associato al fallimento dell'esame è un BMI superiore a 28 (Foucher 2006).

### ACCURATEZZA NELLA DIAGNOSI DI FIBROSI SIGNIFICATIVA

Il primo studio clinico disegnato per valutare la performance diagnostica dell'elastometria epatica ad impulsi rispetto alla biopsia epatica nella stadiazione della fibrosi epatica è stato condotto nel 2003, arruolando 106 pazienti con epatite C cronica. Gli autori dello studio hanno dimostrato per la prima volta che il valore di "*liver stiffness*" ottenuto impiegando il FibroScan aumentava parallelamente allo stadio di fibrosi definito dalla biopsia epatica (Sandrin 2003).

La maggior parte degli studi disegnati successivamente per valutare la performance diagnostica dell'elastometria epatica ad impulsi hanno previsto come termine di confronto la biopsia epatica e hanno impiegato lo score semiquantitativo di METAVIR per la stadiazione istologica della fibrosi epatica.

La performance diagnostica dell'elastometria epatica ad impulsi per la stadiazione della fibrosi epatica in pazienti con epatite C cronica è stata validata in tre importanti studi multicentrici. Nei suddetti studi le aree sottese dalle curve ROC variavano da 0.79 a 0.83 per la diagnosi di fibrosi significativa ( $F \geq 2$ ) e i cut-off ottimali per la differenziazione della fibrosi significativa sono riportati nella tabella XI. E' importante sottolineare che nei suddetti studi, nonostante la buona performance diagnostica dimostrata da questa nuova metodica, è stata evidenziata una parziale sovrapposizione tra i valori di "liver stiffness" in stadi adiacenti di fibrosi, in particolar modo negli stadi intermedi (Ziol 2005, Casterà 2005, Arena 2008).

In una recente meta-analisi condotta includendo 50 studi (15 articoli pubblicati in estenso e 35 abstracts) l'area sottesa dalla curva ROC per la diagnosi di fibrosi significativa è risultata essere 0.84 (95% di intervallo di confidenza, 0.82-0.86) con un cut-off ottimale di 7.6 kPa (Friedrich-Rust 2008). In un'altra importante meta-analisi che includeva 7 studi, la sensibilità di questa nuova metodica nella diagnosi di fibrosi significativa è risultata essere del 70% (95% intervallo di confidenza, 67%-73%), la specificità dell'84% (95% intervallo di confidenza, 80%-88%), il valore predittivo positivo di 4.2 (95% intervallo di confidenza, 2.4-7.2) e il valore predittivo negativo di 0.31 (95% intervallo di confidenza, 0.23-0.43) (Talwalkar 2007).

Autore	Eziologia	N° pz	SF (%)	Cut-offs (kPa)	AUROC	Se (%)	Sp (%)	VPP	VPN
Ziol (2005)	HCV	251	65	8.6	0.79	56	91	6.63	0.48
Castera (2005)	HCV	183	74	7.1	0.83	67	89	6.09	0.37
Arena (2008)	HCV	150	56	7.8	0.91	83	82	4.58	0.20

Tabella XI. Performance diagnostica dell'elastometria epatica nella diagnosi di fibrosi significativa ( $F \geq 2$ ) in pazienti con epatite C cronica [SF, fibrosi significativa; AUROC area sotto la curva ROC; Se, sensibilità; Sp, specificità; VPP, valore predittivo positivo; VPN, valore predittivo negativo].

#### ACCURATEZZA NELLA DIAGNOSI DI CIRROSI

L'accuratezza diagnostica dell'elastometria epatica nella diagnosi di cirrosi epatica è superiore rispetto a quella registrata nell'individuazione della fibrosi significativa. L'area sottesa

dalle curve ROC varia da 0.9 a 0.99 a seconda degli studi considerati e i cut-off per la diagnosi di cirrosi epatica sono riportati nella Tabella XII (Ziol 2005, Castera 2005, Arena 2008).

In due recenti meta-analisi che includevano pazienti con epatopatie croniche di diversa eziologia l'area sottesa dalla curva ROC per la diagnosi di cirrosi epatica è risultata essere 0.94 (95% intervallo di confidenza, 0.93-0.95) (Friedrich-Rust 2008), la sensibilità 87% (95% intervallo di confidenza, 84%-90%), la specificità 91% (95% intervallo di confidenza, 89%-92%), il valore predittivo positivo 11.7 (95% intervallo di confidenza, 7.9-17.1) e il valore predittivo negativo 0.14 (95% intervallo di confidenza, 0.10-0.20) (Talwalkar 2007).

Autore	Eziologia	N° pz	Cirrosi (%)	Cut-offs (kPa)	AUROC	Se (%)	Sp (%)	VPP	VPN
Ziol (2005)	HCV	251	19	14.6	0.97	86	96	23.05	0.14
Castera (2005)	HCV	183	25	12.5	0.95	97	91	9.66	0.14
Arena (2008)	HCV	150	19	14.8	0.98	94	92	11.27	0.07

Tabella XII. Performance diagnostica dell'elastometria epatica nella diagnosi di cirrosi epatica in pazienti con epatite C cronica [AUROC area sotto la curva ROC; Se, sensibilità; Sp, specificità; VPP, valore predittivo positivo; VPN, valore predittivo negativo].



## **PARTE SPERIMENTALE I**

### **L'ELASTOMETRIA EPATICA AD IMPULSI (FIBROSCAN) NELLA STADIAZIONE DELLE EPATOPATIE VIRALI CRONICHE**

#### **INTRODUZIONE**

La prognosi e la gestione clinica dei pazienti con epatopatie croniche è strettamente correlata alla severità della fibrosi epatica, caratteristica principale della maggior parte delle patologie croniche di fegato. Questa affermazione è particolarmente vera per i pazienti con epatite C cronica, che rappresenta attualmente la prima causa di cirrosi epatica e la prima indicazione al trapianto di fegato nei paesi industrializzati e per i pazienti con epatite B cronica, nei quali le scelte terapeutiche sono fortemente condizionate dalla conoscenza dello stadio di fibrosi epatica e della progressione dell'epatopatia.

Fino a qualche anno fa la biopsia epatica era l'unico strumento diagnostico disponibile per la stadiazione delle epatopatie croniche e attualmente è considerata il *gold standard* per la valutazione della fibrosi epatica (Dienstag 2002). La biopsia epatica è comunque un esame invasivo, non privo di complicazioni, costoso e caratterizzato da alcune limitazioni, quali l'errore di campionamento e la variabilità inter e intra-osservatore (Cadranel 2000, Bravo 2001).

Negli ultimi anni sono state pertanto oggetto di studio numerose metodiche non invasive di valutazione della fibrosi epatica. In questo contesto si inserisce l'elastometria epatica ad impulsi, che è una nuova metodica rapida e non invasiva di valutazione dell'elasticità epatica o "*liver stiffness*", indice indiretto della fibrosi epatica.

L'obiettivo del presente studio è quello di paragonare i valori di elasticità epatica ottenuti con questo nuovo strumento diagnostico (FibroScan, *Echosens, Paris, France*) con lo stadio di fibrosi valutato mediante biopsia epatica in pazienti con epatiti croniche virali.

#### **PAZIENTI E METODI**

Nel presente studio sono stati arruolati consecutivamente 74 pazienti con epatiti croniche virali sottoposti a biopsia epatica presso il *Day-Hospital* di Malattie Tropicali del Policlinico Umberto I di Roma tra ottobre 2008 e ottobre 2009. Sono stati inoltre arruolati i pazienti con diagnosi ecografica di cirrosi epatica, non sottoposti a biopsia epatica. I seguenti segni ecografici sono stati considerati indicativi di cirrosi epatica: 1) aspetto polilobato della superficie epatica 2)



diametro della vena porta superiore a 12 mm 3) presenza di circoli collaterali 4) ipertrofia del IV segmento epatico (lobo caudato) (Di Lelio 1989).

La diagnosi di epatite C cronica è stata effettuata in base alla positività degli anticorpi anti-HCV e dell'HCVRNA da almeno sei mesi. I livelli di HCVRNA sono stati determinati mediante real-time PCR (Cobas TaqMan; Roche, Pleasanton, CA, USA), dotata di un limite di sensibilità pari a 10 IU/mL.

La diagnosi di epatite B cronica è stata effettuata in base alla positività dell'HBsAg e dell'HBVDNA da almeno sei mesi. I livelli di HBVDNA sono stati determinati mediante real-time PCR, dotata di un limite di sensibilità pari a 12 IU/mL.

L'elastometria epatica è stata effettuata entro un anno dalla biopsia epatica.

Sono stati esclusi i pazienti con coinfezione HBV/HCV o HIV/HCV, i pazienti con epatopatia cronica di altra eziologia (emocromatosi, malattia di Wilson, epatite autoimmune e deficit di  $\alpha$ 1-antitripsina) o con patologia epatica cronica scompensata, i pazienti con abuso alcolico (assunzione di più di 30 g di etanolo al giorno), i pazienti con scompenso cardiaco o in gravidanza, i pazienti con BMI superiore a 30.

In tutti i pazienti il giorno della biopsia epatica è stata raccolta un'anamnesi accurata, indagando eventuali fattori di rischio per infezioni a trasmissione parenterale e definendo la data della diagnosi di epatite C o B cronica, ed effettuato un esame obiettivo completo. Sono stati effettuati inoltre i seguenti esami ematochimici: emocromo con formula, bilirubina totale e diretta, AST, ALT,  $\gamma$ GT, fosfatasi alcalina, glicemia, colesterolo totale e LDL, trigliceridi, colinesterasi, protidemia, protidogramma, INR, fibrinogeno. Il risultato di una ecografia epato-splenica effettuata entro un anno dalla data di esecuzione dell'elastometria epatica era disponibile per tutti i pazienti arruolati.

Una seconda determinazione dei valori di AST e ALT è stata effettuata entro un mese dall'esecuzione dell'elastometria epatica al fine di escludere variazioni significative rispetto al momento in cui è stata effettuata la biopsia epatica.

### ELASTOMETRIA EPATICA

L'elastometria epatica è stata effettuata utilizzando il FibroScan (*Echosens, Paris, France*). Le misurazioni sono state eseguite da un operatore adeguatamente addestrato, che prima dell'inizio dello studio aveva eseguito almeno 100 esami in pazienti con epatopatie croniche. Le misurazioni

sono state effettuate al livello del lobo epatico di destra, attraverso gli spazi intercostali, mentre il paziente giaceva in decubito dorsale con il braccio destro in massima abduzione. L'estremità della sonda è stata ricoperta con il gel e localizzata sulla cute al livello degli spazi intercostali corrispondenti al lobo destro del fegato. La mediana di 10 acquisizioni valide, espressa in kilopascal, è stata considerata rappresentativa del valore di “*liver stiffness*”. Sono stati considerati esami attendibili quelli caratterizzati da una “*success rate*” superiore al 60% e un “*interquartile range*” inferiore al 25% del valore mediano acquisito.

### ISTOLOGIA EPATICA

Le biopsie epatiche sono state eseguite da un esperto epatologo sotto guida ecografica. Il campione bioptico è stato fissato in formalina ed è stata effettuata la colorazione con ematossilina e eosina seguendo le procedure standard. Tutte le biopsie epatiche sono state valutate da un esperto anatomopatologo. Il grado di necroinfiammazione epatica e lo stadio di fibrosi sono stati valutati secondo lo score di Ishak. La fibrosi è stata classificata in 7 stadi: 0 (assenza di fibrosi), 1 (ingrandimento fibrotico di alcuni spazi portal), 2 (ingrandimento fibrotico della maggior parte degli spazi portal), 3 (ingrandimento fibrotico della maggior parte degli spazi portal con occasionali ponti porto-portal), 4 (ingrandimento fibrotico della maggior parte degli spazi portal con numerosi ponti sia porto-portal sia porto-central), 5 (numerosi ponti porto-portal e porto-central con occasionali noduli), 6 (cirrosi). Il grado di necroinfiammazione è stato stabilito valutando la *piecmeal necrosis*; la *bridging necrosis*; la necrosi focale litica, l'apoptosi e l'infiammazione focale; l'infiammazione portale e attribuendo un punteggio complessivo da 0 a 18 (Ishak 1996).

### ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica è stata condotta impiegando il software SPSS. Tutte le variabili continue sono state espresse come media  $\pm$  deviazione standard. Il test t per campioni appaiati, il test t per campioni non appaiati, il test di Mann-Whitney e il test di Wilcoxon sono stati utilizzati per il confronto delle variabili non parametriche. Una regressione lineare multipla è stata condotta per identificare le variabili indipendenti associate alla “stiffness” epatica, identificata come variabile continua dipendente. L'accuratezza diagnostica dell'elastometria epatica rispetto alla biopsia epatica nella stadiazione della fibrosi epatica è stata valutata calcolando l'area sottesa dalla curva ROC. Un valore di p inferiore a 0.05 è stato considerato statisticamente significativo.

## RISULTATI

Nello studio sono stati arruolati 74 pazienti di età media pari a  $48.4 \pm 13.5$  anni, di cui il 50% di sesso maschile. L'82.4% dei pazienti era affetto da epatite C cronica e il 17.6% dei pazienti era affetto da epatite B cronica come riportato nella tabella I. I parametri biochimici dei pazienti arruolati sono riportati nella tabella II.

CARATTERISTICA	VALORE (media $\pm$ deviazione standard)
Età (anni)	$48.4 \pm 13.5$
Uomini (%)	37/74 (50%)
BMI ( $\text{Kg}/\text{m}^2$ )	$25.7 \pm 3.2$
EZIOLOGIA DELL'EPATITE CRONICA VIRALE	
EPATITE C CRONICA (%)	61/74 (82.4%)
EPATITE B CRONICA (%)	13/74 (17.6%)

Tabella I. Caratteristiche demografiche e eziologia delle epatiti virali nei 74 pazienti arruolati.

PARAMETRO	VALORE (media $\pm$ deviazione standard)
Piastrine ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	$210 \pm 87$
Glicemia (mg/dl)	$89 \pm 18$
Bilirubina totale (mg/dl)	$0.67 \pm 0.3$
GOT (U/L)	$58.2 \pm 49.3$
GPT (U/L)	$83.8 \pm 66.1$
$\gamma\text{GT}$ (U/L)	$45.8 \pm 44$
Fosfatasi alcalina (U/L)	$113.6 \pm 61.6$
Colesterolo totale (mg/dl)	$171 \pm 37$
Colesterolo LDL (mg/dl)	$94 \pm 28$
Trigliceridi (mg/dl)	$99.4 \pm 90.3$
Albumina (g/L)	$4.3 \pm 0.3$
Colinesterasi (UI/mL)	$7985 \pm 2119$
INR	$1.05 \pm 0.1$
Fibrinogeno (mg/dl)	$288.6 \pm 73.2$

Tabella II. Parametri biochimici dei 74 pazienti arruolati nello studio.

Il campione biotico analizzato aveva una lunghezza media pari a  $24.45 \pm 10.1$  mm. La distribuzione della fibrosi epatica nella popolazione esaminata è schematizzata nella tabella III.

Complessivamente il 54% dei pazienti aveva una fibrosi assente o minima (F0 e F1-2, rispettivamente), il 22% dei pazienti aveva una fibrosi significativa (F 3-4) e il 24% dei pazienti aveva una cirrosi (F 5-6).

STAGE DI ISHAK	N° PAZIENTI (%)	N° PAZIENTI (%)
0	4/74 (5.4%)	40/74 (54%)
1	13/74 (17.6%)	
2	23/74 (31%)	
3	12/74 (16.2%)	16/74 (22%)
4	4/74 (5.4%)	
5	5/74 (6.8%)	18/74 (24%)
5	13/74 (17.6%)	

Tabella III. Distribuzione della fibrosi epatica nella popolazione esaminata.

Le misurazioni di *stiffness* epatica avevano valori compresi tra 3.5 kPa e 48 kPa. Il valore medio di “success rate” delle misurazioni effettuate è stato 99.6%.

L’accuratezza diagnostica dell’elastometria epatica nella stadiazione della fibrosi epatica è stata valutata suddividendo i pazienti in 3 gruppi: 1) pazienti con fibrosi assente o minima (F0 e F1-2, rispettivamente) 2) pazienti con fibrosi significativa (F3-4) 3) pazienti con cirrosi (F5-6). I valori medi di *stiffness* epatica e i rispettivi *range* di questi tre gruppi di pazienti sono riportati nella tabella IV e rappresentati graficamente nella figura I.

	Gruppo 1 Fibrosi assente o minima	Gruppo 2 Fibrosi significativa	Gruppo 3 Cirrosi
ISHAK	F 0-1-2	F 3-4	F 5-6
N° pazienti (%)	40 (54%)	16 (22%)	18 (24%)
<i>Stiffness</i> epatica kPa (media $\pm$ ds)	6.3 $\pm$ 1.8	8.7 $\pm$ 3.4	26.6 $\pm$ 11.2
<i>Stiffness</i> epatica kPa (valore minimo)	3.5	5.1	12
<i>Stiffness</i> epatica kPa (valore massimo)	12.1	17.1	48

Tabella IV. Valori di *stiffness* epatica rispetto ai diversi stadi di fibrosi nei 74 pazienti arruolati.

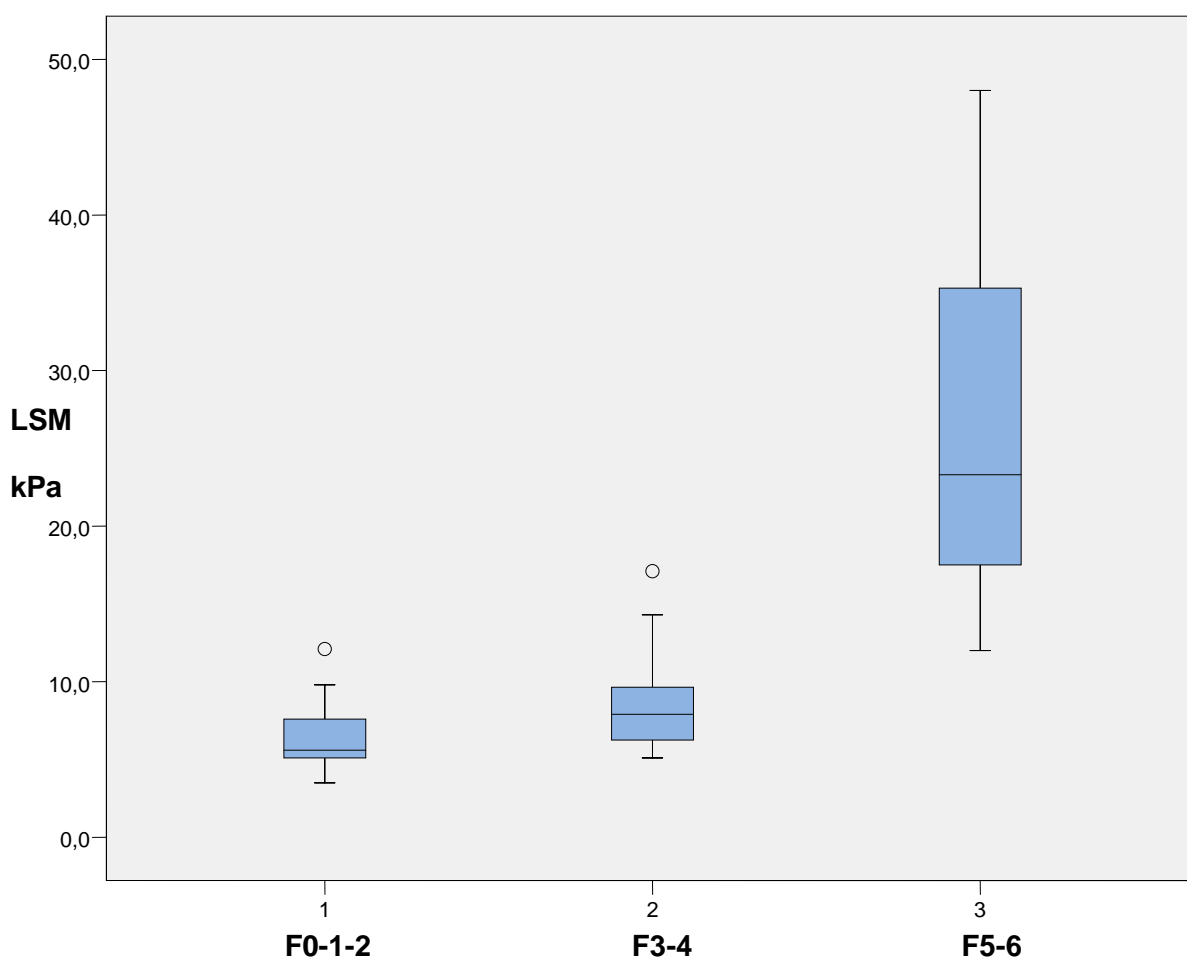
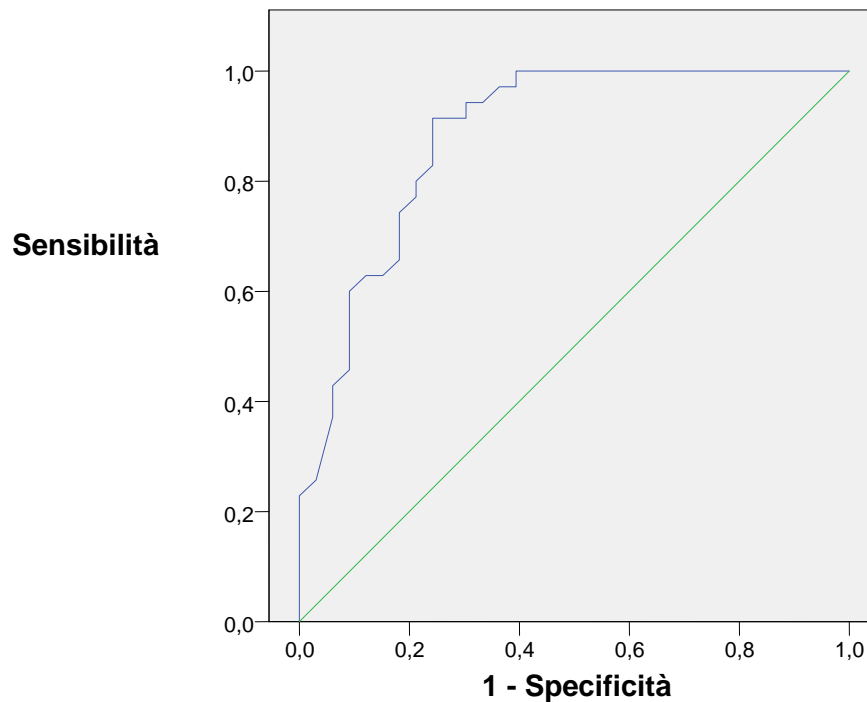


Figura I. Variazione dei valori di *stiffness* epatica rispetto agli stadi di fibrosi epatica.

L'area sottesa dalla curva ROC per la diagnosi di fibrosi significativa ( $F \geq 3$ ) è risultata essere 0.88 (95% intervallo di confidenza 0.8-0.96), con un cut-off ottimale di *stiffness* epatica per la diagnosi di fibrosi significativa pari a 8.65 kPa (figura 2). La sensibilità e la specificità dell'elastometria epatica nella diagnosi di fibrosi significativa sono risultate essere 91.5% e 76%, rispettivamente. I suddetti parametri sono schematizzati nella tabella V.

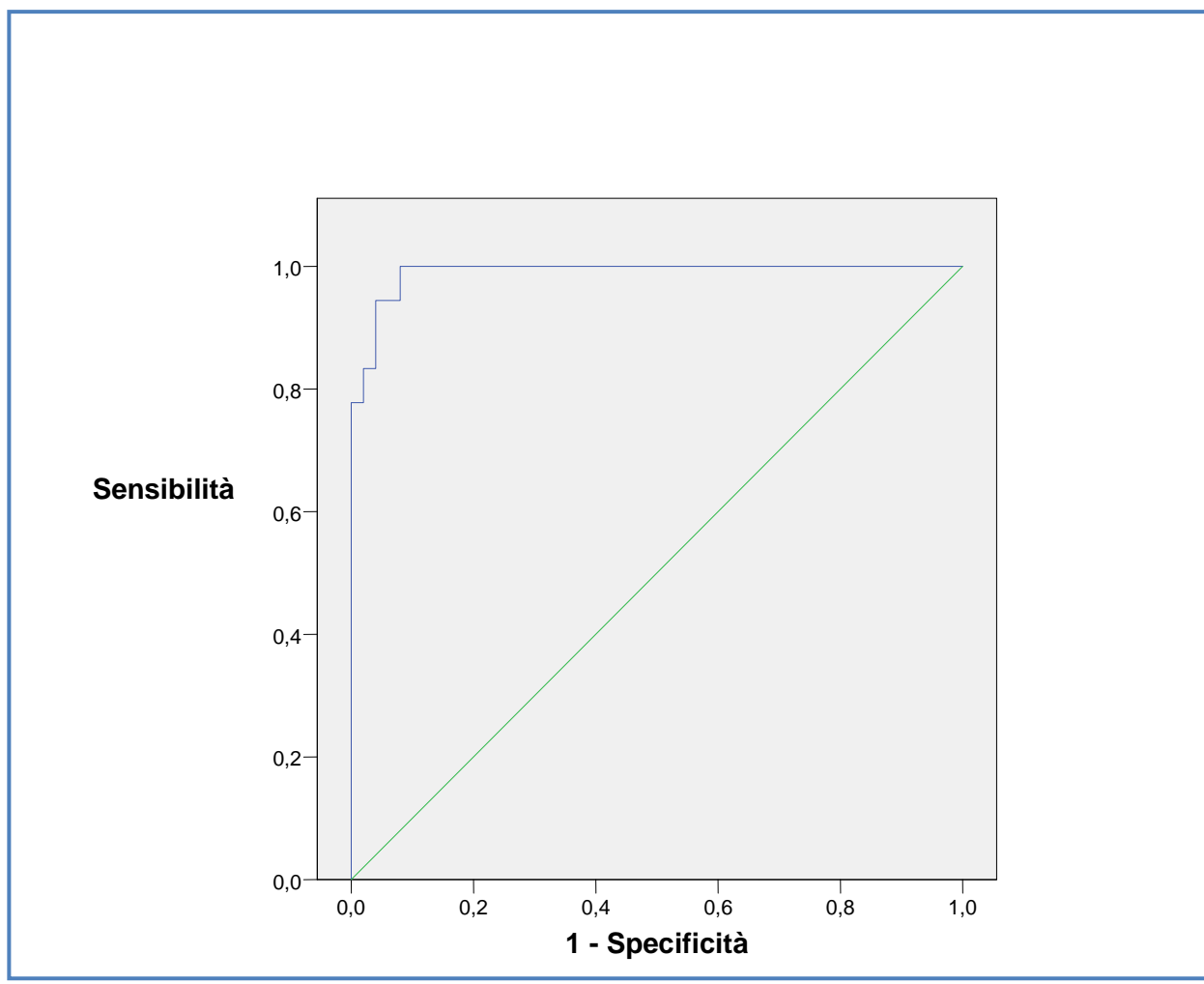
L'area sottesa alla curva ROC per la diagnosi di cirrosi ( $F \geq 5$ ) è risultata essere 0.99 (95% intervallo di confidenza 0.97-1), con un cut-off ottimale di *stiffness* epatica per la diagnosi cirrosi pari a 13 kPa (figura III). La sensibilità e la specificità dell'elastometria epatica nella diagnosi di cirrosi sono risultate essere 94.5% e 96%, rispettivamente. I suddetti parametri sono schematizzati nella tabella V.



**Figura II. Curva ROC per la diagnosi di fibrosi significativa ( $F \geq 3$ )**

	Fibrosi significativa ( $F \geq 3$ )	Cirrosi ( $F \geq 5$ )
AUROC (95% IC)	0.88	0.99
Cut-off ottimale (kPa)	8.65	13
Sensibilità	91.5%	94.5%
Specificità	76%	96%

**Tabella V. Performance diagnostica dell'elastometria epatica nell'individuazione della fibrosi significativa ( $F \geq 3$ ) e della cirrosi epatica ( $F \geq 5$ ).**



**Figura III. Curva ROC per la diagnosi di cirrosi ( $F \geq 5$ ).**

### DISCUSSIONE

La stadiazione della fibrosi epatica è di fondamentale importanza per definire la prognosi e indirizzare le scelte terapeutiche sia nei pazienti con epatite C cronica che in quelli con epatite B cronica.

Nel nostro studio abbiamo dimostrato una stretta correlazione tra i valori di “*stiffness*” epatica, determinati impiegando il FibroScan e gli stadi di fibrosi epatica, classificati impiegando il sistema di Ishak e determinati mediante biopsia epatica nei pazienti con epatiti virali croniche.

In accordo con i lavori di ricerca finora pubblicati (Ziol 2005, Castera 2005, Arena 2008), il nostro studio ha confermato che l’elastometria epatica è una metodica affidabile nell’individuare la presenza di fibrosi epatica significativa e cirrosi epatica nei pazienti con epatiti virali croniche. Infatti le aree sottese dalle curve ROC per la diagnosi di fibrosi significativa e di cirrosi epatica sono risultate essere di 0.88 e di 0.99, rispettivamente.

E' importante sottolineare che tutti i lavori finora pubblicati impiegano il sistema METAVIR per la stadiazione della fibrosi epatica, invece nel nostro studio è stato impiegato il sistema Ishak per definirla. Un recente studio di confronto tra Ishak e METAVIR ha dimostrato una concordanza quasi perfetta (weighted kappa 0,998) nella definizione dello stadio di fibrosi tra i due sistemi, secondo gli autori di questo lavoro il sistema di Ishak sembra comunque preferibile per uno *staging* più dettagliato dell'epatopatia cronica, in particolar modo negli stadi intermedi di malattia, in cui lo sviluppo della cirrosi non è ancora conclamato ma il grado di fibrosi è già significativo (Rozario 2003). Questa è probabilmente la ragione per cui l'elastometria epatica, nel nostro studio, ha dimostrato di possedere una performance diagnostica ancor più elevata nell'identificazione della cirrosi epatica rispetto a quella registrata in altri studi (Ziol 2005), con valori di sensibilità e di specificità pari al 94.5% e al 96% rispettivamente.

Questa osservazione è di fondamentale importanza per un impiego razionale dell'elastometria epatica nella pratica clinica. Essendo il FibroScan un esame rapido e non invasivo può essere effettuato con una frequenza di gran lunga superiore rispetto alla biopsia epatica, di conseguenza è uno strumento diagnostico di grande utilità nel *follow-up* dei pazienti con epatiti virali croniche, permettendo di individuare precocemente la cirrosi epatica e di monitorizzare e gestire tempestivamente le eventuali complicanze.

I cut-off identificati dal nostro studio sono praticamente sovrapponibili a quelli individuati da studi precedentemente pubblicati (Sandrin 2003, Ziol 2005), infatti abbiamo individuato un cut-off pari a 8.65 kPa per la diagnosi di fibrosi significativa e un cut-off pari a 13 kPa per la diagnosi di cirrosi epatica. Variazioni di modesta entità dei nostri valori di cut-off possono essere dovute ad una differente distribuzione dei fattori in grado di influenzare il risultato dell'elastometria epatica nella popolazione di pazienti con epatiti virali croniche da noi esaminata oppure ad una differente prevalenza dei diversi stadi di fibrosi nei pazienti arruolati nel nostro studio. Le suddette differenze potrebbero inoltre essere dovute alla presenza di una modesta percentuale di pazienti con epatite B cronica, per i quali i cut-off da impiegare potrebbero essere leggermente differenti rispetto a quelli utilizzati nei pazienti con epatite C cronica (Marcellin 2008).

Il grafico rappresentato nella figura I indica chiaramente che anche se i pazienti con cirrosi epatica (F5-6) sono nettamente separati dal resto della popolazione esaminata, una parziale sovrapposizione si osserva tra i pazienti con fibrosi epatica assente o minima (F0, F1, F2) e quelli con fibrosi epatica significativa (F3-F4). Il nostro studio conferma pertanto che l'elastometria epatica è una metodica relativamente poco accurata nel differenziare gli stadi intermedi di fibrosi.



In accordo con i precedenti lavori anche il nostro studio non ha evidenziato una correlazione tra l'entità della steatosi epatica e il valore di “*stiffness epatica*” (dati non mostrati), dobbiamo comunque sottolineare il fatto che nessuno dei pazienti arruolati aveva una steatosi severa ( $> 60\%$ ).

E' importante sottolineare che il nostro studio ha delle limitazioni.

In primo luogo lo studio è stato condotto su un numero relativamente limitato di pazienti.

In secondo luogo abbiamo utilizzato la biopsia epatica come “gold standard” di riferimento, che pur essendo il miglior termine di paragone attualmente disponibile non è perfetto. Infatti anche quando la biopsia epatica è eseguita da un operatore esperto e valutata da un anatomopatologo altrettanto esperto, l'attribuzione dello stadio di fibrosi può risultare erronea in una percentuale di casi pari al 20% (Maharaj 1986). Nel nostro caso questo errore dovrebbe essere stato limitato dal fatto che il campione biotico aveva una lunghezza media pari a  $24.45 \pm 10.1$  mm, corrispondente alle dimensioni indicate come ottimali da Bedossa per la corretta stadiazione della fibrosi epatica (Bedossa 2003).

In terzo luogo il nostro studio è retrospettivo, ossia i pazienti arruolati avevano eseguito la biopsia epatica entro un anno dall'arruolamento nello studio stesso. In ogni caso bias correlato ad una possibile variazione dei valori di transaminasi nel periodo di tempo intercorso tra l'esecuzione dei due esami così introdotto è stato sicuramente limitato dal fatto che abbiamo confrontato i valori di transaminasi in corrispondenza della biopsia epatica e dell'esame elastomerico e non abbiamo riscontrato differenze statisticamente significative (dati non mostrati).

I risultati del nostro studio indicano che l'elastometria epatica può sostituire la biopsia epatica per la stadiazione della fibrosi epatica in una certa percentuale di pazienti affetti da epatiti croniche virali. Dal momento che l'esame è rapido e non invasivo può risultare di grande utilità nel *follow up* dei pazienti affetti da epatopatie croniche.

E' importante comunque sottolineare che l'elastometria epatica è un esame con alcune limitazioni, in particolar modo è difficile da eseguire nei pazienti obesi ( $BMI > 30$ ) che sono stati pertanto esclusi dalla popolazione esaminata nel nostro studio.

In conclusione possiamo affermare che la gestione terapeutica e il *follow up* dei pazienti affetti da epatite C o epatite B cronica è strettamente correlata all'entità della fibrosi epatica. Attualmente la biopsia epatica è una procedura diagnostica sottoposta ad una revisione critica, pur mantenendo il suo ruolo da protagonista nella definizione dello stadio di fibrosi epatica. Nuove metodiche non invasive, sia sierologiche che strumentali, per la stadiazione della fibrosi epatica

sono attualmente in fase di studio e validazione, tra queste l'elastometria epatica ha un ruolo di primo piano. Essendo un esame semplice, rapido, ben accettato dal paziente e caratterizzato da una buona *performance* diagnostica nell'identificazione della fibrosi epatica significativa e della cirrosi permetterà al clinico un più accurato monitoraggio della progressione dell'epatopatia e una migliore gestione clinica, ancor più se impiegato in associazione con i marcatori sierici di fibrosi epatica. Essendo l'elastometria epatica una metodica diagnostica di recente introduzione nella pratica clinica sarà molto importante definire in futuro in modo accurato le variabili in grado di interferire con i valori di *stiffness* epatica, alterando il risultato dell'esame e causando una stadiazione non corretta della fibrosi epatica.

## **PARTE SPERIMENTALE II**

### **ELASTOMETRIA EPATICA AD IMPULSI (FIBROSCAN) ED EPATITE ACUTA**

#### **INTRODUZIONE**

L'elastometria epatica (FibroScan) è una metodica non invasiva recentemente introdotta nella pratica clinica per la determinazione indiretta della fibrosi epatica. Essa viene attualmente considerata una metodica altamente riproducibile e accurata per la valutazione della fibrosi epatica, in particolar modo nei pazienti con epatiti croniche virali. Nonostante ciò alcuni studi hanno dimostrato che il risultato di questo esame è influenzato dal grado di necroinfiammazione epatica nei pazienti con epatiti virali croniche (Fraquelli 2007, Vispo 2009) e da variazioni significative dei valori di transaminasi sia nei pazienti con epatite B cronica (Coco 2007, Wong 2009) che in quelli con epatite C cronica (Vispo 2009). Inoltre nei pazienti con epatiti acute di svariata eziologia l'elastometria epatica non è risultata essere una metodica affidabile per la stadiazione della fibrosi epatica in generale e della cirrosi epatica in particolare (Sagir 2008, Arena 2008). Risultati contrastanti sono stati ottenuti per quanto concerne la definizione dei marcatori biochimici (bilirubina o transaminasi) che correlano con la misura elastometrica durante il decorso dell'epatite acuta (Sagir 2008, Arena 2008, Kim 2009, Seo 2008).

Il nostro studio è stato disegnato per definire l'impatto della necroinfiammazione epatica sulle misurazioni elastometriche e per individuare i parametri biochimici che correlano con tali alterazioni in pazienti senza storia di epatopatia cronica con diagnosi di epatite virale acuta di diversa eziologia seguiti longitudinalmente dall'esordio alla risoluzione dell'epatite acuta stessa.

#### **PAZIENTI E METODI**

Nello studio sono stati arruolati consecutivamente 7 pazienti ricoverati presso il reparto o l'ambulatorio di epatologia dell'Istituto di Malattie Tropicali del Policlinico Umberto I di Roma, tra maggio 2009 e ottobre 2009 con diagnosi di epatite acuta.

La diagnosi di epatite acuta è stata posta in base alla presenza di livelli di alanina aminotransferasi (ALT) 10 volte superiori rispetto al valore normale. La diagnosi eziologica è stata posta in base alla presenza di positività degli anticorpi anti-HAVIgM per l'epatite A acuta, al riscontro di sieroconversione degli anticorpi anti-HCV e positività dell'HCVRNA per l'epatite C acuta e alla presenza di ANA positività per la diagnosi di epatite autoimmune.

Al momento della diagnosi i pazienti hanno effettuato un'ecografia addome superiore e un'elastometria epatica presso il Servizio di Ecografia della nostra struttura.

Sono stati esclusi i pazienti con BMI superiore a 30, la presenza di ascite all'esame obiettivo o ecografico, la presenza di epatopatia cronica precedente l'insorgenza dell'epatite acuta e valutata mediante l'analisi degli esami ematochimici e strumentali disponibili nei sei mesi precedenti al ricovero, la presenza di coinfezione con HIV, di abuso alcolico (consumo di più di 30 g di etanolo al giorno), l'assunzione di farmaci epatotossici nei sei mesi precedenti l'arruolamento nello studio, la presenza di scompenso cardiaco e la gravidanza.

In ciascun paziente la determinazione dei valori di transaminasi e l'esecuzione dell'elastometria epatica sono state effettuate lo stesso giorno e secondo la seguente tempistica: una prima determinazione corrispondente al primo giorno di osservazione, una seconda determinazione quando il valore di ALT si era ridotto almeno del 50% rispetto al valore massimo raggiunto, una terza determinazione quando i valori di ALT erano al massimo 2 volte superiori rispetto al valore normale.

In corrispondenza della prima visita è stata raccolta un'anamnesi accurata, in modo da caratterizzare la sintomatologia clinica precedente l'esordio dell'epatite acuta. Il primo giorno di osservazione sono stati inoltre effettuati i seguenti esami di laboratorio: bilirubina totale e diretta, transaminasi (aspartato amino-transferasi -AST- e alanina amino-transferasi -ALT-), gamma glutamil-transferasi ( $\gamma$ GT), fosfatasi alcalina (ALP), albumina, glicemia, conta piastrinica, PT (INR), fibrinogeno, colinesterasi.

### ELASTOMETRIA EPATICA

L'elastometria epatica è stata effettuata utilizzando il FibroScan (*Echosens, Paris, France*). Le misurazioni sono state eseguite da un operatore adeguatamente addestrato, che prima dell'inizio dello studio aveva eseguito almeno 100 esami in pazienti con epatopatie croniche. La mediana di 10 acquisizioni valide, espressa in kilopascal, è stata considerata rappresentativa del valore di "liver stiffness". Sono stati considerati esami attendibili quelli caratterizzati da una "success rate" superiore al 60% e un "interquartile range" inferiore al 25% del valore mediano acquisito.

### ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica è stata condotta impiegando il software SPSS. Tutti i risultati sono stati espressi come media  $\pm$  deviazione standard. Il test t per campioni appaiati, il test t per campioni non appaiati, il test di Mann-Whitney e il test di Wilcoxon sono stati utilizzati per il confronto delle

variabili non parametriche. Un valore di  $p$  inferiore a 0.05 è stato considerato statisticamente significativo.

### RISULTATI

Nello studio sono stati arruolati 7 pazienti (5 uomini e 2 donne, età media  $40.3 \pm 3.4$ ; range 31-57 anni). Le eziologie delle epatiti acute dei 7 pazienti arruolati erano le seguenti: epatite A acuta in 5 casi su 7 (71.4%), epatite C acuta in 1 caso su 7 (14.3%), epatite autoimmune in 1 caso su 7 (14.3%). Il tempo medio tra l'insorgenza dei sintomi e l'accesso in ospedale è stato di  $10.1 \pm 4.6$  giorni, 1 paziente era asintomatico. Le caratteristiche epidemiologiche, cliniche e biochimiche dei pazienti arruolati nello studio sono riportate nella tabella I.

CARATTERISTICHE	VALORE (media $\pm$ deviazione standard)
Età (anni)	$40.3 \pm 3.4$
Uomini, n (%)	5/7 (71.4%)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	$24.5 \pm 2.3$
Tempo intercorso tra l'insorgenza dei sintomi e/o segni e l'accesso in ospedale (giorni)	$10.1 \pm 4.6$
SEGNI O SINTOMI	
Assenza di segni o sintomi	1/7 (14.3%)
Anoressia	1/7 (14.3%)
Nausea e vomito	4/7 (57.1%)
Dolore addominale	2/7 (28.6%)
Malessere generale	4/7 (57.1%)
Febbre	4/7 (57.1%)
Ittero	6/7 (85.7%)

Tabella I. Caratteristiche epidemiologiche e cliniche dei pazienti arruolati nello studio.

Al momento dell'arruolamento nello studio e durante il *follow-up* nessun paziente ha presentato le caratteristiche cliniche e biochimiche tipiche di un'epatite fulminante.

L'ecografia epato-splenica ha evidenziato la presenza di epatomegalia in 4 casi su 7 (57.1%), la presenza di steatosi epatica in 3 casi su 7 (42.8%) e la presenza di splenomegalia in 1 caso su 7 (14.3%). Nessun paziente presentava i segni ecografici caratteristici delle epatopatie evolute e/o della cirrosi epatica.

I parametri biochimici all'esordio e alla risoluzione dell'epatite acuta sono riportati nella tabella II.

Il primo giorno di osservazione coincideva con il picco di ALT in 6 casi su 7 (85.7%). Tutti i pazienti avevano valori di transaminasi nella norma al termine del periodo di *follow-up* ad eccezione di due, che presentavano comunque una modesta ipertransaminasemia (valori di ALT non superiori a due volte il valore normale). I parametri biochimici che hanno subito variazioni statisticamente significative dal primo giorno di osservazione al termine del follow-up sono risultati essere i livelli di AST ( $1048 \pm 1023.8$  vs  $31.1 \pm 15.8$ ,  $p=0.018$ ), di ALT ( $2072 \pm 1475.6$  vs  $55.4 \pm 34.1$ ,  $p=0.018$ ) e bilirubina totale ( $7.6 \pm 6.8$  vs  $1.15 \pm 0.4$ ,  $p=0.028$ ).

DATI BIOCHIMICI	ESORDIO (media $\pm$ ds)	FINE FOLLOW UP (media $\pm$ ds)	ESORDIO VS FINE FOLLOW UP (media $\pm$ ds)
<b>Bilirubina Totale (mg/dl)</b>	<b>7.6 <math>\pm</math> 6.8</b>	<b>1.15 <math>\pm</math> 0.4</b>	<b>0.028</b>
<b>AST (U/L)</b>	<b>1048.6 <math>\pm</math> 1023.8</b>	<b>31.1 <math>\pm</math> 15.8</b>	<b>0.018</b>
<b>ALT (U/L)</b>	<b>2072 <math>\pm</math> 1475.6</b>	<b>55.4 <math>\pm</math> 34.1</b>	<b>0.018</b>
INR	1.2 $\pm$ 0.1	1 $\pm$ 0.8	0.08
Fibrinogeno (mg/dl)	348.2 $\pm$ 121	272.2 $\pm$ 43.5	0.7
Piastrine ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	236 $\pm$ 71	214 $\pm$ 104	1

Tabella III. Dati biochimici all'esordio dell'epatite acuta e a fine follow up dei pazienti arruolati.

Durante il periodo di osservazione di questo studio nessun paziente ha effettuato un trattamento antivirale.

I valori di transaminasi, di bilirubina e di *stiffness* epatica di ogni paziente arruolato nei tre intervalli temporali prescelti sono riportati nella tabella III.

In tutti i pazienti ad eccezione di uno si è verificata una progressiva riduzione dei valori di *stiffness* epatica parallelamente alla riduzione dei valori di transaminasi e di bilirubina. Al termine del *follow-up*, quando i valori di transaminasi non eccedevano di più di 2 volte il limite superiore della norma, in tutti i pazienti i valori di *stiffness* epatica si sono normalizzati ( $<7$  kPa).

Una correlazione statisticamente significativa è stata osservata tra i valori di bilirubina totale, i valori di transaminasi e i valori di *stiffness* epatica in corrispondenza dell'esordio dell'epatite acuta come rappresentato nella figura I.

		Prima determinazione				Seconda determinazione				Terza determinazione			
Pz (n)	Eziologia	AST	ALT	Bil	LS	AST	ALT	Bil	LS	AST	ALT	Bil	LS
1	Epatite A	1854	3221	1.6	6.8	124	1140	5	11.8	30	45	1.2	6.2
2	Epatite A	303	766	3.8	10.8	129	177	0.6	9.2	60	113	1	6.3
3	Epatite A	383	2258	8.7	8.1	48	115	0.8	7.3	21	26	0.9	6.1
4	Epatite A	89	353	6.9	5.6	35	82	1	4.9	27	46	0.8	5.9
5	Epatite C	179	697	0.4	5.5	15	64	0.8	10.8	10	20	0.8	6.9
6	Epatite A	2275	3124	20	9.9	101	228	1.8	10.1	29	47	1	5.5
7	Epatite Autoimmune	2257	4085	12	16	111	454	2.8	7.8	41	91	2	6
M		1048	2072	7.6	8.96	80	323	1.8	8.84	31	55	1.1	6.13

Tabella 3. Determinazioni sequenziali dei livelli di AST, ALT, bilirubina totale e “liver stiffness” durante il decorso dell’epatite acuta.

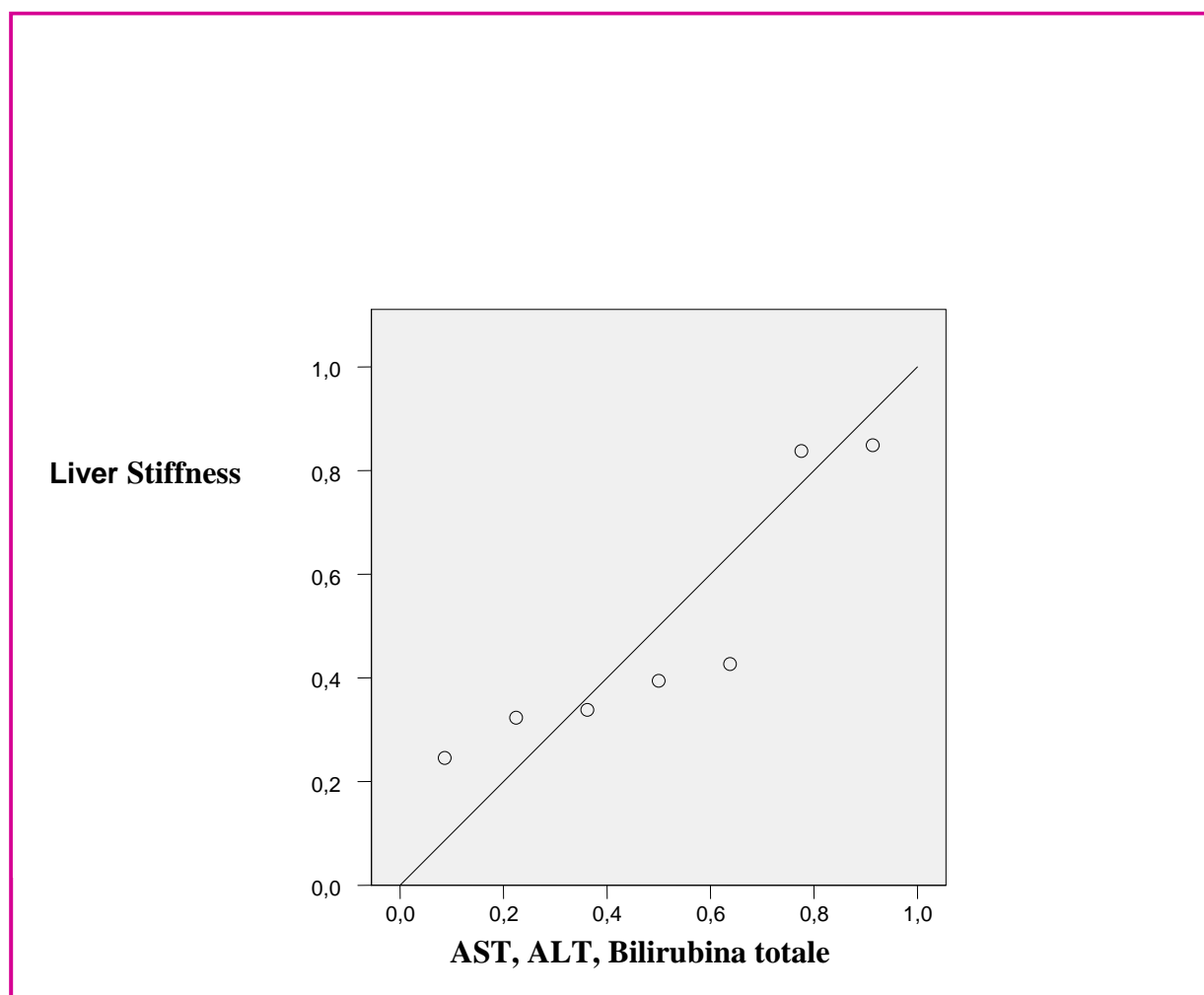


Figura I. Correlazione tra AST, ALT, bilirubina totale e liver stiffness nei pazienti arruolati in corrispondenza dell’esordio dell’epatite acuta.

## DISCUSSIONE

L'elastometria epatica è una metodica innovativa e promettente per la stadiazione delle epatopatie croniche. Questa metodica è attualmente in fase di validazione in numerosi studi trasversali e longitudinali. Un elemento di fondamentale importanza nel processo di validazione di una nuova metodica diagnostica consiste nell'identificazione dei potenziali fattori confondenti in grado di influenzare il risultato dell'esame, causando una sovrastima o una sottostima della fibrosi epatica determinata con questa metodica. In questo contesto la presenza di un esteso infiltrato infiammatorio, un incremento della componente epatocitaria e la presenza di edema tissutale, che sono elementi caratteristici del processo di riparazione conseguente ad uno stimolo lesivo e del processo di fibrogenesi epatica, rappresentano un importante fattore confondente.

Gli studi attualmente pubblicati hanno dimostrato che durante l'epatite acuta, indipendentemente dall'eziologia, l'elastometria epatica fornisce una sovrastima della fibrosi epatica (Sagir 2008). Risultati discordanti riguardano l'identificazione di quale sia il parametro biochimico che correla con l'alterazione dell'elastometria epatica durante l'epatite acuta. Alcuni studi dimostrano una stretta correlazione con i valori di transaminasi (Arena 2008), altri studi con i valori di bilirubina totale (Sagir 2008, Kim 2008, Seo 2008).

Il nostro studio conferma che i cambiamenti della composizione del tessuto epatico durante un'epatite acuta influenzano in modo significativo i valori di *stiffness* epatica, determinando un'erronea sovrastima del danno epatico in termini di fibrosi epatica. Il fatto che i valori di *stiffness* epatica riscontrati all'esordio di un'epatite acuta non siano indicativi della presenza di una fibrosi epatica significativa o addirittura di cirrosi epatica è confermato dalla progressiva normalizzazione di tali misurazioni parallelamente alla normalizzazione dei valori di transaminasi e di bilirubina. Le implicazioni pratiche di questa osservazione consistono nel fatto che prima di effettuare una misurazione elastometrica epatica è importante valutare attentamente sia i livelli di transaminasi che i livelli di bilirubina.

E' interessante notare che il valore della misurazione elastometrica epatica tende a normalizzarsi più lentamente rispetto alla normalizzazione dei valori di transaminasi e di bilirubina, è pertanto plausibile che la normalizzazione di tale misurazione richieda un periodo di tempo più lungo rispetto alla normalizzazione dei parametri biochimici. Questa osservazione è in accordo con quanto osservato durante i *flares* di transaminasi nei pazienti con epatite B cronica (Coco 2007) ed è importante per scegliere la tempistica ottimale di esecuzione di questo esame rispetto alle alterazioni dei parametri biochimici, in particolar modo dei valori di transaminasi e di bilirubina.



Una limitazione del nostro studio consiste nel fatto che i pazienti arruolati non sono stati sottoposti a biopsia epatica in quanto non vi erano le indicazioni cliniche per poterla eseguire, pertanto non possediamo un termine di confronto istologico per la valutazione della fibrosi epatica e di conseguenza per stabilire una corrispondenza con le misurazioni elastometriche ottenute sia all'esordio che dopo la risoluzione dell'epatite acuta. In ogni caso il fatto che in tutti i pazienti il valore elastometrico ottenuto al termine del *follow-up* fosse normale e corrispondesse pertanto all'assenza di fibrosi significativa e l'attenta esclusione dei pazienti con anamnesi, diagnosi biochimica e/o ecografica di pregressa epatopatia cronica ci permette di asserire con un buon margine di sicurezza che tutti i pazienti arruolati non presentassero epatopatie croniche precedenti l'esordio dell'epatite acuta.

## **PARTE SPERIMENTALE III**

### **ELASTOMETRIA EPATICA AD IMPULSI (FIBROSCAN) E TRATTAMENTO DIALITICO**

#### **INTRODUZIONE**

La prevalenza dell'epatite C cronica nei pazienti in trattamento dialitico varia dal 7% al 40% a seconda degli studi considerati ed è considerata complessivamente almeno 10 volte superiore rispetto alla popolazione generale (Jadoul 2004, Petrosillo 2001, Fabrizi 20002, Zampieron 2006).

Nei pazienti in trattamento dialitico la presenza dell'uremia cronica determina una riduzione dei livelli medi di transaminasi, che pur essendo più elevati nei pazienti HCV positivi rispetto a quelli HCV negativi, non hanno un valore predittivo di danno epatico (Saab 2001). Le transaminasi non sono pertanto un parametro utilizzabile nella diagnosi e nella quantificazione del danno epatico nei pazienti con infezione cronica HCV correlata in trattamento dialitico (Yasuda 1995, Guh 1995).

Nei pazienti in trattamento dialitico la biopsia epatica non è uno strumento diagnostico frequentemente utilizzato per la stadiazione della fibrosi epatica in quanto le alterazioni della coagulazione associate all'uremia determinano un maggior rischio di sanguinamento in seguito alla procedura (Fabrizi 2002).

Numerosi studi dimostrano che l'epatite C cronica ha un effetto sfavorevole sulla sopravvivenza dei pazienti in trattamento dialitico determinando un incremento dell'incidenza di cirrosi epatica ed epatocarcinoma (Nakayama 2000, Stehman-Breen 1998, Espinosa 2001). Inoltre è stato dimostrato che l'infezione cronica HCV correlata nel paziente sottoposto a trapianto di rene ha un effetto negativo sia sulla sopravvivenza che in misura minore sull'organo trapiantato (Hanafusa 1998, Legendre 1998, Bruchfeld 2004, Pedroso 2006, Mejer-Kriesche 2001, Pereira 1998).

Una accurata stadiazione dell'epatopatia HCV correlata è pertanto di fondamentale importanza nella gestione del paziente dializzato, al fine di definire la necessità del trattamento antivirale, di monitorizzare la progressione dell'epatopatia nel tempo e per stabilire il timing ottimale di un eventuale trapianto di rene.

Ad oggi non vi sono studi pubblicati in letteratura che valutino l'accuratezza diagnostica dell'elastometria epatica ad impulsi nella stadiazione della fibrosi epatica in pazienti con epatite C cronica in trattamento dialitico.

Un dato fondamentale per rispondere al suddetto quesito è definire se il trattamento dialitico determina di per sé una variazione delle misurazioni elastometriche epatiche, sia in presenza che in assenza di un'epatopatia cronica, in modo da definire il timing ottimale di esecuzione dell'esame rispetto al trattamento dialitico in questa tipologia di pazienti.

Il presente studio è stato pertanto disegnato con lo scopo di definire se il trattamento dialitico è un fattore in grado di alterare le misurazioni elastometriche epatiche.

### PAZIENTI E METODI

Nello studio sono stati arruolati 27 pazienti in trattamento dialitico presso il Servizio di Emodialisi dell'Istituto di Nefrologia del Policlinico Umberto I di Roma.

E' stata raccolta un'anamnesi accurata per definire l'eziologia dell'insufficienza renale cronica ed individuare eventuali patologie concomitanti, è stato effettuato un esame obiettivo completo e si è presa visione di un esame ecografico epato-splenico effettuato entro un anno dall'arruolamento nello studio.

L'elastometria epatica è stata eseguita prima dell'inizio del trattamento dialitico e dopo la fine del trattamento stesso.

I seguenti parametri biochimici sono stati valutati lo stesso giorno in cui è stato eseguito l'esame elastomerico: emocromo, AST, ALT,  $\gamma$ GT, colesterolo, trigliceridi, glicemia, azotemia, creatinina, sodio, potassio, uricemia.

Sono stati inoltre valutati i seguenti markers sierologici: HBsAg e HCVAb.

La diagnosi di epatite C cronica è stata posta in base alla positività degli anticorpi Anti-HCV e alla positività dell'HCVRNA da almeno sei mesi. I livelli di HCVRNA sono stati determinati mediante real-time PCR (Cobas TaqMan; Roche, Pleasanton, CA, USA), dotata di un limite di sensibilità pari a 10 IU/mL.

La pressione arteriosa (diastolica e sistolica) e il peso sono stati valutati prima e dopo il trattamento dialitico.

I criteri di esclusione prevedevano un BMI superiore a 30, la presenza di scompenso cardiaco e la gravidanza.

### ELASTOMETRIA EPATICA

L'elastometria epatica è stata effettuata utilizzando il FibroScan (*Echosens, Paris, France*). Le misurazioni sono state eseguite da un operatore adeguatamente addestrato, che prima dell'inizio dello studio aveva eseguito almeno 100 esami in pazienti con epatopatie croniche. Le misurazioni sono state effettuate al livello del lobo epatico di destra, attraverso gli spazi intercostali, mentre il paziente giaceva in decubito dorsale con il braccio destro in massima abduzione. L'estremità della sonda è stata ricoperta con il gel e localizzata sulla cute al livello degli spazi intercostali corrispondenti al lobo destro del fegato. E' stato quindi scelto un punto adeguato per effettuare le misurazioni ed è stato contrassegnato, al fine di effettuare le due misurazioni nello stesso punto. La mediana di 10 acquisizioni valide, espressa in kilopascal, è stata considerata rappresentativa del valore di "*liver stiffness*". Sono stati considerati esami attendibili quelli caratterizzati da una "*success rate*" superiore al 60% e un "*interquartile range*" inferiore al 25% del valore mediano acquisito.

### ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica è stata condotta impiegando il software SPSS. Tutte le variabili continue sono state espresse come media  $\pm$  deviazione standard. Il test t per campioni appaiati, il test t per campioni non appaiati, il test di Mann-Whitney e il test di Wilcoxon sono stati utilizzati per il confronto delle variabili non parametriche. Una regressione lineare multipla è stata condotta per identificare le variabili indipendenti associate alla "*stiffness*" epatica, identificata come variabile continua dipendente. Un valore di p inferiore a 0.05 è stato considerato statisticamente significativo.

### RISULTATI

Sono stati arruolati 27 pazienti con età media pari a  $57.3 \pm 16$  anni, la maggior parte dei quali di sesso maschile (66.7%). In circa la metà dei dializzati (44.4%) l'eziologia dell'insufficienza renale cronica era rappresentata dalla malattia policistica renale o da glomerulonefriti di svariata natura. La prevalenza di anti-HCV positività e la prevalenza di epatite C cronica sono risultate essere pari al 29.6% e al 18.5%, rispettivamente. Le caratteristiche demografiche, anamnestiche, sierologiche e i parametri biochimici di tutti i pazienti arruolati nello studio sono riportati nelle tabelle I e II.

CARATTERISTICHE	VALORE (media $\pm$ deviazione standard)
Età (anni)	57.3 $\pm$ 16
Uomini (%)	18/27 (66.7%)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25.8 $\pm$ 3.5
Prevalenza HBsAg positività	0
Prevalenza anti-HCV positività	8/27 (29.6%)
Prevalenza epatite C cronica	5/27 (18.5%)
EZIOLOGIA INSUFFICIENZA RENALE CRONICA	
Rene policistico	6/27 (22.2%)
Glomerulonefrite	6/27 (22.2%)
Nefropatia diabetica	3/27 (11.1%)
Reflusso vescico-ureterale	2/27 (7.4%)
Nefropatia ipertensiva	1/27 (3.7%)
Insufficienza renale cronica di altra natura	9/27 (33.4%)

Tabella I. Caratteristiche demografiche, anamnestiche e sierologiche dei pazienti arruolati nello studio.

PARAMETRO BIOCHIMICO	VALORE (media $\pm$ deviazione standard)
Piastrine (10 <sup>3</sup> /μL)	218 $\pm$ 76
AST (UI/mL)	12.41 $\pm$ 6.801
ALT (UI/mL)	13.7 $\pm$ 8.717
γGT (U/L)	30.44 $\pm$ 33.788
Glicemia (mg/dl)	101.11 $\pm$ 26.528
Colesterolo totale (mg/dl)	166.7 $\pm$ 36.2
Colesterolo LDL (mg/dl)	90.2 $\pm$ 34.5
Trigliceridi (mg/dl)	184.1 $\pm$ 135
Creatinina (mg/dl)	10.61 $\pm$ 2.746

Tabella II. Parametri biochimici dei pazienti arruolati nello studio.

I pazienti con epatite C cronica erano tendenzialmente più giovani rispetto quelli non affetti da epatite C cronica (età media 49.6  $\pm$  19.5 vs 59.09  $\pm$  15.1, p=0.08). I parametri biochimici valutati risultavano paragonabili nei due gruppi di pazienti analizzati e sono riportati nella tabella III.

PARAMETRO BIOCHIMICO	VALORE (media $\pm$ deviazione standard)		
	Dializzati con epatite C cronica	Dializzati senza epatite C cronica	P
Età (anni)	49.6 $\pm$ 19.5	59.09 $\pm$ 15.1	0.08
Piastrine (10 <sup>3</sup> /μL)	242 $\pm$ 131	213 $\pm$ 61	0.928
AST (UI/mL)	11.2 $\pm$ 10.2	12.68 $\pm$ 6.1	0.411
ALT (UI/mL)	17 $\pm$ 13	12.95 $\pm$ 7.7	0.606
γGT (U/L)	30.4 $\pm$ 24	30.45 $\pm$ 36.1	0.976
Glicemia (mg/dl)	95.6 $\pm$ 9.2	102.36 $\pm$ 29.1	0.928
Colesterolo totale (mg/dl)	163.8 $\pm$ 30.9	167.4 $\pm$ 37.9	0.832
Colesterolo LDL (mg/dl)	80.8 $\pm$ 41.9	92.36 $\pm$ 33.5	0.524
Trigliceridi (mg/dl)	200 $\pm$ 96.2	184.1 $\pm$ 135.1	0.411
Creatinina (mg/dl)	9.72 $\pm$ 2.368	10.81 $\pm$ 2.835	0.650

Tabella III. Confronto tra le caratteristiche demografiche e biochimiche dei pazienti dializzati con epatite C cronica e dei pazienti dializzati senza epatite C cronica.

Il peso dei pazienti prima del trattamento dialitico è risultato essere significativamente superiore rispetto a quello registrato alla fine del trattamento stesso (72.2  $\pm$  15.9 vs 69.3  $\pm$  15.5,  $p < 0.01$ ). La pressione arteriosa sistolica e diastolica sono invece rimaste invariate prima e dopo il trattamento dialitico come riportato nella tabella IV.

CARATTERISTICA	PRE-DIALISI (media $\pm$ ds)	POST-DIALISI (media $\pm$ ds)	P
Pressione arteriosa sistolica (mmHg)	137.5 $\pm$ 28.1	127.9 $\pm$ 30.9	0.163
Pressione arteriosa diastolica (mmHg)	78.5 $\pm$ 16.1	75.6 $\pm$ 14.7	0.324
Peso (kg)	72.2 $\pm$ 15.9	69.3 $\pm$ 15.5	<0.01

Tabella IV. Confronto tra il peso e la pressione arteriosa dei pazienti arruolati prima e dopo il trattamento dialitico.

Nei pazienti arruolati il valore medio di “*stiffness*” epatica prima e dopo il trattamento dialitico è risultato essere 7  $\pm$  3.9 kPa e 6.97  $\pm$  4.2 KPa, rispettivamente. All’analisi multivariata i livelli di alanina amino-transferasi e di γGT sono risultati indipendentemente correlati ai valori di “*stiffness*” epatica sia prima che dopo il trattamento dialitico come riportato nella tabella V.

	<i>Stiffness</i> epatica pre-dialisi			<i>Stiffness</i> epatica post-dialisi		
	Analisi Multivariata			Analisi Multivariata		
VARIABILE	B	ES	P	B	ES	P
Piastrine	0.000	0.000	0.886	0.000	0.000	0.56
GOT	-0.236	0.144	0.618	-0.436	0.057	0.148
<b>GPT</b>	<b>0.028</b>	<b>0.316</b>	<b>0.022</b>	<b>0.035</b>	<b>0.34</b>	<b>0.019</b>
<b>γGT</b>	<b>0.032</b>	<b>0.101</b>	<b>0.001</b>	<b>0.054</b>	<b>0.127</b>	<b>&lt;0.001</b>
Glicemia	-0.051	0.039	0.784	-0.024	0.071	0.314
Colesterolo TOT	-0.077	0.012	0.141	-0.048	0.046	0.969
Trigliceridi	-0.001	0.02	0.074	-0.005	0.017	0.283
Creatinina	-0.606	0.208	0.318	-0.453	0.409	0.916

Tabella V. Analisi multivariata dei fattori associati alla “*stiffness*” epatica nei 27 pazienti arruolati nello studio.

Nei pazienti dializzati con epatite C cronica il valore medio di “*stiffness*” epatica prima del trattamento dialitico è risultato essere tendenzialmente superiore rispetto a quello registrato dopo il trattamento dialitico ( $9.4 \pm 3.1$  kPa vs  $6.5 \pm 2.1$  kPa,  $p=0.068$ ), una tendenza opposta è stata invece evidenziata nei pazienti dializzati non affetti da epatite C cronica ( $6.5 \pm 3.9$  kPa vs  $7 \pm 4.5$  kPa,  $p=0.059$ ). I suddetti risultati sono schematizzati nella tabella VI e nella figura I.

CARATTERISTICA	PRE-DIALISI (media $\pm$ ds)	POST-DIALISI (media $\pm$ ds)	P
PAZIENTI DIALIZZATI			
Liver <i>stiffness</i> (kPa)	$7 \pm 3.9$	$6.97 \pm 4.2$	0.572
PAZIENTI DIALIZZATI CON EPATITE C CRONICA			
Liver <i>stiffness</i> (kPa)	$9.4 \pm 3.1$	$6.5 \pm 2.1$	0.068
PAZIENTI DIALIZZATI NON AFFETTI DA EPATITE C CRONICA			
Liver <i>stiffness</i> (kPa)	$6.5 \pm 3.9$	$7 \pm 4.5$	0.059

Tabella VI. Valori di “*stiffness*” epatica prima e dopo il trattamento dialitico in tutti i dializzati, nei dializzati con epatite C cronica e nei dializzati senza epatite C cronica.

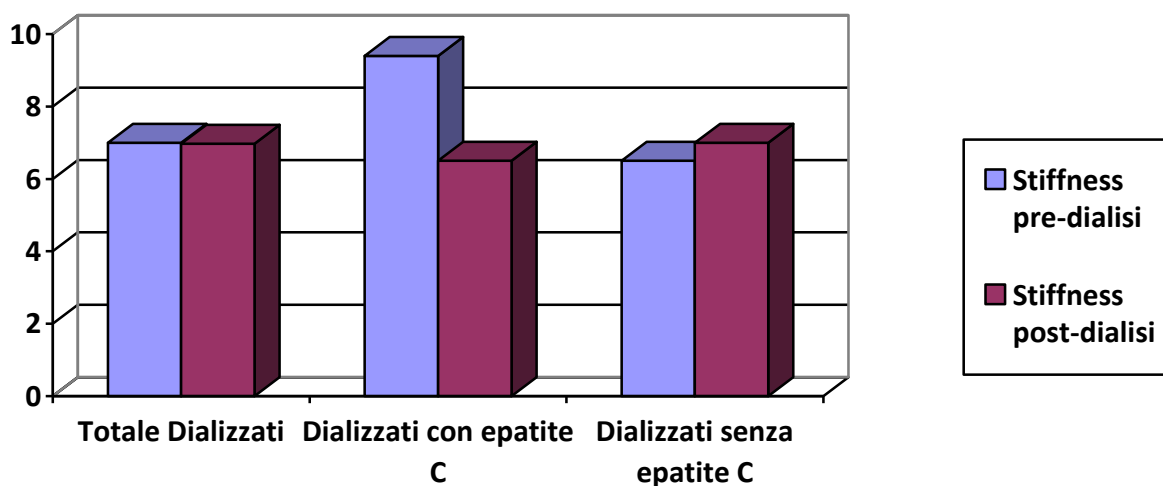


Figura I. Variazione dei valori di “*stiffness*” epatica prima e dopo il trattamento dialitico in tutti i dializzati, nei dializzati con epatite C cronica e nei dializzati senza epatite C cronica.

### DISCUSSIONE

La prevalenza dell’epatite C cronica nei pazienti in trattamento dialitico è considerata complessivamente almeno 10 volte superiore rispetto alla popolazione generale, variando dal 7% al 40% a seconda degli studi considerati (Jadoul 2004, Petrosillo 2001, Fabrizi 20002, Zampieron 2006).

Una accurata stadiazione dell’epatopatia cronica HCV correlata è pertanto di fondamentale importanza nella gestione del paziente dializzato, al fine di definire la necessità del trattamento antivirale, di monitorizzare la progressione dell’epatopatia nel tempo e per stabilire il timing ottimale di un eventuale trapianto di rene.

L’elastometria epatica è una metodica innovativa e promettente per la stadiazione delle epatopatie croniche. Questa metodica è attualmente in fase di validazione in numerosi studi trasversali e longitudinali.

Alcuni lavori presenti in letteratura (Arena 2008, Sagir 2008) e lo studio presentato nella seconda parte di questo lavoro suggeriscono che la presenza di un esteso infiltrato infiammatorio, l’incremento della componente epatocitaria e la presenza di edema tissutale che si verificano durante un’epatite acuta rappresentano un importante fattore confondente nella determinazione della *stiffness* epatica, determinando una sovrastima del corrispondente stadio di fibrosi. Lo stesso fenomeno si verifica in presenza di colestasi extraepatica (Millonig 2008).



Un elemento di fondamentale importanza nel processo di validazione di una nuova metodica diagnostica consiste nell'identificazione dei potenziali fattori confondenti in grado di influenzare il risultato dell'esame, causando una sovrastima o una sottostima della fibrosi epatica determinata con questa metodica.

In questo contesto abbiamo disegnato il presente studio per analizzare l'effetto del trattamento dialitico sulla misurazione della *stiffness* epatica.

Nei pazienti dializzati arruolati nel nostro studio si è verificata una riduzione di peso statisticamente significativa prima e dopo il trattamento dialitico ( $72.2 \pm 15.9$  kg vs  $69.3 \pm 15.5$ ;  $p < 0.01$ ). Tale riduzione di peso è presumibilmente associata ad una riduzione della quantità di liquidi al livello corporeo e di conseguenza anche al livello del fegato. Tale riduzione potrebbe potenzialmente alterare il risultato dell'elastometria epatica.

Il nostro studio ha dimostrato che il trattamento dialitico non modifica il valore della *stiffness* epatica nell'intera popolazione di pazienti arruolati. Se però analizziamo separatamente il gruppo dei pazienti con epatite C cronica e il gruppo dei pazienti non affetti da epatite C cronica notiamo una variazione prossima alla significatività statistica. In dettaglio nei dializzati non affetti da epatite C cronica i valori di *stiffness* epatica tendono ad aumentare dopo il trattamento dialitico ( $6.5 \pm 3.9$  kPa vs  $7 \pm 4.5$  kPa,  $p = 0.059$ ). In questo caso comunque l'entità media della variazione è talmente limitata (0.5 kPa) da non causare una misclassificazione del corrispondente stadio di fibrosi. Al contrario nei dializzati con epatite C cronica i valori di *stiffness* epatica tendono a ridursi dopo il trattamento dialitico ( $9.4 \pm 3.1$  kPa vs  $6.5 \pm 2.1$  kPa,  $p = 0.068$ ), tale differenza non risulta statisticamente significativa probabilmente a causa della scarsità numerica dei pazienti esaminati appartenenti a questo gruppo (5 casi). In questo caso comunque l'entità media della variazione è elevata (2.9 kPa) e comporterebbe una chiara misclassificazione del corrispondente stadio di fibrosi, soprattutto considerando che valori di *stiffness* epatica inferiori a 5.5-6 kPa corrispondono ad un fegato sano (Corpechot 2006, Roulot 2008) mentre valori di *stiffness* epatica superiori a 7.7-8.5 sono indicativi della presenza di fibrosi significativa a seconda degli studi considerati (Ziol 2005, Castera 2005, Arena 2008). Questa osservazione è di fondamentale importanza se consideriamo la necessità a fini prognostici e terapeutici di ottenere una corretta stadiazione della fibrosi epatica in questa categoria di pazienti.

Un altro risultato molto interessante del nostro studio è la stretta correlazione individuata tra i livelli di alanina amino-transferasi (ALT) e i valori di *stiffness* epatica, soprattutto se consideriamo che i pazienti arruolati presentavano un valore medio di ALT normale ( $13.7$  U/L  $\pm 8.717$ ). Studi

presenti in letteratura evidenziano una stretta correlazione tra l'entità dei *flares* di transaminasi nei pazienti con epatite B cronica e i valori di *stiffness* epatica (Coco 2007, Olivieri 2008). E' inoltre accertato che nei pazienti in trattamento dialitico la presenza dell'uremia cronica determina una riduzione dei livelli medi di transaminasi, che pur essendo più elevati nei pazienti HCV positivi rispetto a quelli HCV negativi, non hanno un valore predittivo di danno epatico (Saab 2001). In questa tipologia di pazienti valori di ALT normali non escludono la presenza di una moderata citonecrosi epatica e possono pertanto influenzare le misurazioni di *stiffness* epatica.

Infine è stata dimostrata una stretta correlazione tra i valori di gamma-glutamyl transferasi ( $\gamma$ GT) e i valori di *stiffness* epatica. Questa correlazione è stata anche individuata in un recente lavoro condotto su pazienti con epatite C cronica (Petta 2009). Questa associazione potrebbe essere dovuta al fatto che le  $\gamma$ GT sono un marcatore surrogato dell'espressione di TNF- $\alpha$  intra-epatico (Taliani 2002), un indice di colestasi (Sotil 2004), un indice della presenza di steatosi e di fibrosi epatica (Imbert-Bismut 2001).

In conclusione possiamo affermare che il trattamento dialitico sembra influenzare i valori di *stiffness* epatica nei pazienti dializzati, determinando una misclassificazione significativa del corrispondente stadio di fibrosi in particolar modo nei pazienti con epatite C cronica. E' pertanto di fondamentale importanza valutare la performance diagnostica dell'elastometria epatica in questa tipologia di pazienti e disegnare uno studio su una casistica più ampia per validare i risultati preliminari evidenziati dal nostro lavoro di ricerca.

## ***Bibliografia***

- Adams LA, Bulsala M, Rossi E et al. Hepascore: an accurate validated predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C infection. *Clin Chem* 2005; 51(10): 1867-73.
- Anderson FH, Zeng L, Rock NR et al. An assessment of the clinical utility of serum ALT and AST in chronic hepatitis C. *Hepatol Res* 2000; 18: 63–71.
- Arena U, Vizzutti F, Gorti G et al. Acute viral hepatitis increases liver stiffness values measured by transient elastography. *Hepatology* 2008; 47(2): 380-384.
- Arena U, Vizzutti F, Abraldes JG et al. Reliability of transient elastography for the diagnosis of advanced fibrosis in chronic hepatitis C. *Gut* 2008; 57(9): 1288–1293.
- Arthur MJ. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: G245–G249.
- Aster RH. Pooling of platelets in the spleen: role in the pathogenesis of “hypersplenic” thrombocytopenia. *J Clin Invest* 1966; 45: 645–657.
- Bataller R, North KE, Brenner DA. Genetic polymorphisms and the progression of liver fibrosis: a critical appraisal. *Hepatology* 2003; 37: 493–503.
- Bataller R. NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis. *J Clin Invest* 2003; 112: 1383–1394.
- Bataller R. Activated human hepatic stellate cells express the renin-angiotensin system and synthesize angiotensin II. *Gastroenterology* 2003; 125: 117–125.
- Bateller R, Brenner D. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115(2): 209-218.
- Bedossa P, Poynard T and the Metavir Cooperative Group. Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 1994; 20: 15-20.
- Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1996; 24: 289-293.
- Bedossa P, Dargere D, Paradis V. Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38: 1449-1457.
- Benyon RC, Arthur MJ. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 373–384.
- Blanc JF. Investigation of liver fibrosis in clinical practice. *Hepatol Res* 2005; 32: 1-8.
- Boeker KH, Haberkorn CI, Michels D et al. Diagnostic potential of circulating TIMP-1 and MMP-2 as markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Clin Chim Acta* 2002; 316: 71–81.

- Borkham-Kamphorst E, Stoll D, Gressner AM et al. Antisense strategy against PDGF B-chain proves effective in preventing experimental liver fibrogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 321: 413–423.
- Boursier J, Konate A, Guilluy M et al. Learning curve and interobserver reproducibility evaluation of liver stiffness measurement by transient elastography. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008; 20(7): 693–701.
- Bravo AA, Shieth SG, Chopra S. Liver biopsy. *New Engl J Med* 2001; 344(7): 495-499.
- Bruchfeld A, Wilczek H, Elinder CG. Hepatitis C infection, time in renal-replacement therapy, and outcome after kidney transplantation. *Transplantation* 2004; 78: 745-750.
- Brunt E.M. Grading and staging the histopathological lesions of chronic hepatitis: the Knodell histology activity index and beyond. *Hepatology* 2000; 31: 241-246.
- Cadranel JF, Rufat P, Degos F. Practices of liver biopsy in France: results of a prospective nationwide survey. For the Group of Epidemiology of the French Association for the Study of the Liver (AFEFL). *Hepatology* 2000; 32: 477–481.
- Camps J, Garcia-Granero M, Riezu-Boi JJ et al. Prediction of sustained remission of chronic hepatitis C after 1-2 month course of alfa-interferon. *J Hepatol* 1994; 21: 4-11.
- Canbay A. Fas enhances fibrogenesis in the bile duct ligated mouse: a link between apoptosis and fibrosis. *Gastroenterology* 2002; 123: 1323–1330.
- Canbay A, Friedman S, Gores GJ. Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology* 2004; 39: 273–278.
- Casini A. Neutrophil-derived superoxide anion induces lipid peroxidation and stimulates collagen synthesis in human hepatic stellate cells: role of nitric oxide. *Hepatology* 1997; 25: 361–367.
- Castera L, Vergniol J, Foucher J et al. Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2005; 128(2): 343–350.
- Castera L. Transient elastography and other non invasive tests to assess hepatic fibrosis in patients with viral hepatitis. *J Viral Hep* 2009; 16: 300-314.
- Chen TJ, Liaw YF. The prognostic significance of bridging hepatic necrosis in chronic type B hepatitis: a histopathologic study. *Liver* 1988; 8: 10-16.
- Cho JJ. An oral endothelin-A receptor antagonist blocks collagen synthesis and deposition in advanced rat liver fibrosis. *Gastroenterology* 2000; 118: 1169–1178.

- Christensen C, Bruden D, Livingston S et al. Diagnostic accuracy of a fibrosis serum panel (FIBROSpect II) compared with Knodell and Ishak liver biopsy scores in chronic hepatitis C patients. *J Viral Hepat* 2006; 13: 652– 658.
- Coco B, Olivieri F, Maina AM et al. Transient elastography: a new surrogate marker of liver fibrosis influenced by major changes of transaminases. *J Viral Hepat* 2007; 14: 360-369.
- Corperchot C, El Naggar A, Poupon R. Gender and liver: is the liver stiffness weaker in the weaker sex? *Hepatology* 2006; 44(2): 513-14.
- Croquet A. Prothrombin index in an indirect marker of severe liver fibrosis. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2002; 14(10): 1133-41.
- Davis GL, Albright JE, Cook SF et al. Projecting future complications of chronic hepatitis C in the United States. *Liver Transpl* 2003; 9: 331–338.
- Di Lelio A, Cestari C, Lomazzi A et al. Cirrhosis: diagnosis with sonographic study of the liver surface. *Radiology* 1989; 172: 389-392.
- Dienstag JL. The role of liver biopsy in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36: S152– S160.
- Espinosa M, Martin-Malo A, Alvarez de Lara MA et al. Risk of death and liver cirrhosis in anti-HCV positive long-term haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 1669-1674.
- Fabrizi F, Poordad FF, Martin P. Hepatitis C Infection and the Patient With End-Stage Renal Disease. *Hepatology* 2002; 36:3-10.
- Foucher J, Castera L, Bernard PH et al. Prevalence and factors associated with failure of liver stiffness measurement using FibroScan in a prospective study of 2114 examinations. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18(4): 411–412.
- Forbes SJ. A significant proportion of myofibroblasts are of bone marrow origin in human liver fibrosis. *Gastroenterology* 2004; 126: 955–963.
- Forns X, Ampurdanes S, Llovet JM et al. Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology* 2002; 36: 986–992.
- Fraquelli M, Rigamonti C, Casazza G et al. Reproducibility of transient elastography in the evaluation of liver fibrosis in patients with chronic liver disease. *Gut* 2007; 56: 968-973.
- Friedman SL. Liver fibrosis - from bench to bedside. *J Hepatol* 2003; 38(S1):S38–S53.
- Friedrich-Rust M, Ong MF, Martens S et al. Performance of transient elastography for the staging of liver fibrosis: a meta-analysis. *Gastroenterology* 2008; 134(4): 960–974.

- Gabrielli GB, Capra F, Casaril M et al. Serum laminin and type III procollagen in chronic hepatitis C. Diagnostic value in the assessment of disease activity and fibrosis. *Clin Chim Acta* 1997; 265: 21–31.
- Geerts A. History, heterogeneity, developmental biology and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 311–335.
- Giannini E, Caglieris S, Ceppa P et al. Serum pro-collagen III peptide levels are related to lobular necrosis in untreated patients with chronic hepatitis C. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13: 137–141.
- Giannini E, Risso D, Botta F et al. Validity and clinical utility of the aspartate aminotransferase-alanine aminotransferase ratio in assessing disease severity and prognosis, in patients with hepatitis C virus related chronic liver disease. *Arch Intern Med* 2003; 163: 218-24.
- Gines P, Cardenas A, Arroyo V et al. Management of cirrhosis and ascites. *N Engl J Med* 2004; 350: 1646–1654.
- Goldin RD, Goldin JG, Burt AD et al. Intra-observer and inter-observer variation in the histopathological assessment of chronic viral hepatitis. *J Hepatol* 1996; 25: 649–54.
- Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K et al. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7: d793–d807.
- Guechot J, Laudat A, Loria A et al. Diagnostic accuracy of hyaluronan and type III procollagen amino-terminal peptide serum assays as markers of liver fibrosis in chronic viral hepatitis C evaluated by ROC curve analysis. *Clin Chem* 1996; 42: 558–563.
- Guh J, Lai Y, Yang CY et al. Impact of decreased serum transaminase levels on the evaluation of viral hepatitis in hemodialysis patients. *Nephron* 1995; 99: 1969-1974.
- Guido M, Rugge M. Liver biopsy sampling in chronic viral hepatitis. *Semin Liver Dis* 2004; 24:89-97.
- Gunneson TJ, Menon KV, Wiesner RH et al. Ultrasound assisted percutaneous liver biopsy performed by a physician assistant. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 1472-1475.
- Halfon P, Imbert-Bismut F, Messous D et al. A prospective assessment of the inter-laboratory variability of biochemical markers of fibrosis (FibroTest) and activity (ActiTest) in patients with chronic liver disease. *Comp Hepatol* 2002; 1:3.
- Hanafusa T, Ichikawa Y, Kishikawa H et al. Retrospective study on the impact of hepatitis C virus infection on kidney transplant patients over 20 years. *Transplantation* 1998; 66: 471-476.

- Hayasaka A, Suzuki N, Fujimoto N et al. Elevated plasma levels of matrix metalloproteinase-9 (92-kd type IV collagenase/gelatinase B) in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1996; 24: 1058–1062.
- Higuchi H, Gores GJ. Mechanisms of liver injury: an overview. *Curr Mol Med* 2003; 3: 483–490.
- Ikejima K. Leptin receptor-mediated signaling regulates hepatic fibrogenesis and remodeling of extracellular matrix in the rat. *Gastroenterology* 2002; 122:1399–1410.
- Imbert-Bismut F, Ratziu V, Pieroni L et al. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. *Lancet* 2001; 357: 1069–1075.
- Imperiale TF, Said AT, Cummings OW et al. Need for validation of clinical decision aids: use of the AST/ALT ratio in predicting cirrhosis in chronic hepatitis C. *American Journal of Gastroenterology* 2000; 95: 2328-32.
- Ishak K, Baptista A, Bianchi L et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995; 22: 696-699.
- Jadoul M, Poignet JL, Geddes C et al. The changing epidemiology of hepatitis C virus (HCV) infection in haemodialysis: European multicentre study. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19: 904-909.
- Johansen JS, Christoffersen P, Moller S et al. Serum YKL-40 is increased in patients with hepatic fibrosis. *J Hepatol* 2000; 32: 911–920.
- Kage M et al. Long term evolution of fibrosis from chronic hepatitis to cirrhosis in patients with hepatitis C: morphometric analysis of repeated biopsies. *Hepatology* 1997; 25: 1028-1031.
- Kamada Y. Enhanced carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice lacking adiponectin. *Gastroenterology* 2003; 125: 1796–1807.
- Kamimoto Y, Horiuchi S, Tanase S et al. Plasma clearance of intravenously injected aspartate aminotransferase isozymes: evidence for preferential uptake by sinusoidal liver cells. *Hepatology* 1985; 5: 367–375.
- Kanno K, Tazuma S, Chayama K. AT1A-deficient mice show less severe progression of liver fibrosis induced by CCl<sub>4</sub>. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 308: 177–183.
- Kawasaki T, Takeshita A, Souda K et al. Serum thrombopoietin levels in patients with chronic hepatitis and liver cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 1918–1922.
- Kelleher TB, Mehta SH, Bhaskar R et al. Prediction of hepatic fibrosis in HIV-HCV coinfecting patients using serum fibrosis markers: the SHASTA index. *J Hepatol* 2005; 43(1): 78-84.

- Kim SU, Han KH, Park JY et al. Liver stiffness measurement using FibroScan is influenced by serum total bilirubin in acute hepatitis. *Liver Int* 2009; 29 (6): 810-815.
- Kinnman N, Housset C. Peribiliary myofibroblasts in biliary type liver fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7: d496–d503.
- Knodell RG, Ishak JK, Black WC et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981; 1: 431-436.
- Koda M, Matunaga Y, Kawakami M et al. FibroIndex, a practical index for predicting significant fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2007; 45: 297–306.
- Koziel MJ. Cytokines in viral hepatitis. *Semin Liver Dis* 1999; 19(2): 157-69.
- Larrousse M, Laguno M, Segarra M et al. Noninvasive diagnosis of hepatic fibrosis in HIV/HCV-coinfected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007; 46: 304 –311.
- Ledinghen V, Vergniol J. Transient elastography (FibroScan). *Gastroenterol Clin Biol* 2008; 32: 58-67.
- Legendre C, Garrigue V, Le Bihan C et al. Harmful long term impact of hepatitis C virus infection in kidney transplant recipient. *Transplantation* 1998; 65: 667-670.
- Lindquist JN, Marzluft WF, Stefanovic B. Fibrogenesis. III. Posttranscriptional regulation of type I collagen. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: G471–G476.
- Lindquist JN, Parsons CJ, Stefanovic B et al. Regulation of alpha1(I) collagen messenger RNA decay by interactions with alphaCP at the 3'-untranslated region. *J Biol Chem* 2004; 279: 23822–23829.
- Lucidarme D, Foucher J, Le Bail B et al. Factors of accuracy of transient elastography (Fibroscan) for the diagnosis of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2009; 49: 1083-1089.
- Maharaj B, Maharaj RJ, Leary WP et al. Sampling variability and its influence on the diagnostic yield of percutaneous needle biopsy of the liver. *Lancet* 1986; 1: 523-525.
- Maher JJ. Interactions between hepatic stellate cells and the immune system. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 417–426.
- Manning DS, Afdhal NH. Diagnosis and quantification of fibrosis. *Gastroenterology* 2008; 134: 1670-1681.
- Marcellin P, Ziol M, Bedossa P et al. Non-invasive assessment of liver fibrosis by stiffness measurement in patients with chronic hepatitis B. *Liver Int* 2009; 32: 242-247.
- Marra F. Hepatic stellate cells and the regulation of liver inflammation. *J Hepatol* 1999; 31: 1120–1130.



- Marra F. Chemokines in liver inflammation and fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7: d1899–d1914.
- Marra F. Leptin and liver fibrosis: a matter of fat. *Gastroenterology* 2002; 122:1529–1532.
- McClain CJ, Cohen DA. Increased tumor necrosis factor production by monocytes in alcoholic hepatitis. *Hepatology* 1989; 9: 349–351.
- McGary CT, Raja RH, Weigel PH. Endocytosis of hyaluronic acid by rat liver endothelial cells. Evidence for receptor recycling. *Biochem J* 1989; 257: 875–884.
- McGill D, Rakela J, Zinsmeister AR et al. A 21 year experience with major hemorrhage after percutaneous liver biopsy. *Gastroenterology* 1990; 99: 1396-1400.
- Mejer-Kriesche HU, Ojo AO, Hanson JA et al. Hepatitis C antibody status and outcomes in renal transplant recipients. *Transplantation* 2001; 72: 241-244.
- Millonig G, Reimann FM, Friedrich S et al. Extrahepatic cholestasis increases liver stiffness (FibroScan) irrespective of fibrosis. *Hepatology* 2008; 48:1718-1723.
- Murawaki Y, Ikuta Y, Okamoto K et al. Serum matrix metalloproteinase-3 (stromelysin-1) concentration in patients with chronic liver disease. *J Hepatol* 1999; 31: 474–481.
- Murawaki Y, Ikuta Y, Okamoto K et al. Diagnostic value of serum markers of connective tissue turnover for predicting histological staging and grading in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* 2001; 36: 399–406.
- Myers RP, Benhamou Y, Imbert-Bismut F et al. Serum biochemical markers accurately predict liver fibrosis in HIV and hepatitis C virus co-infected patients. *Aids* 2003; 17: 721–725.
- Myers RP, De Torres M, Imbert-Bismut F et al. Biochemical markers of fibrosis in patients with chronic hepatitis C: a comparison with prothrombin time, platelet count, and age-platelet index. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 146–153.
- Naito M, Hasegawa G, Ebe Y et al. Differentiation and function of Kupffer cells. *Med Electron Microsc* 2004; 37: 16–28.
- Nakayama E, Akiba T, Marumo F et al. Prognosis of anti-hepatitis C virus antibody-positive patients on regular hemodialysis therapy. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 1896-1902.
- Nelson DR, Gonzalez-Peralta RP, Qian K et al. Transforming growth factor- $\beta$  1 in chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 1997; 4: 29–35.
- Niemela O, Risteli J, Blake JE et al. Markers of fibrogenesis and basement membrane formation in alcoholic liver disease. Relation to severity, presence of hepatitis and alcoholic intake. *Gastroenterology* 1990; 98: 1612-9.

- Nojgaard C, Johansen JS, Christensen E et al. Serum levels of YKL-40 and PIIINP as prognostic markers in patients with alcoholic liver disease. *J Hepatol* 2003; 39: 179–186.
- Oben JA. Hepatic fibrogenesis require sympathetic neurotransmitters. *Gut* 2004; 53: 438–445.
- Oberti F, Valsesia E, Pilette C et al. Noninvasive diagnosis of hepatic fibrosis or cirrhosis. *Gastroenterology* 1997; 113: 1609–1616.
- Okuno T, Okanoue T, Takino T et al. Prognostic significance of bridging necrosis in chronic active hepatitis. *Gastroenterol Jpn* 1983; 18: 577-584.
- Olaso E. DDR2 receptor promotes MMP-2-mediated proliferation and invasion by hepatic stellate cells. *J Clin Invest* 2001; 108: 1369–1378.
- Olivieri F, Coco B, Ciccorossi P et al. Liver stiffness in the hepatitis B virus carrier: a non-invasive marker of liver disease influenced by the pattern of transaminases. *W J Gastroenterol* 2008; 14(40): 6154-6162.
- Paizis G. Up-regulation of components of the renin-angiotensin system in the bile ductligated rat liver. *Gastroenterology* 2002; 123: 1667-1676.
- Pares A, Deulofeu R, Gimenez A et al. Serum hyaluronate reflects hepatic fibrogenesis in alcoholic liver disease and is useful as a marker of fibrosis. *Hepatology* 1996; 24: 1399–1403.
- Pedroso S, Martins L, Fonseca I et al. Impact of hepatitis C virus on renal transplantation: association with poor survival. *Transplant Proc* 2006; 38: 1890-1894.
- Pereira BJG, Natov SN, Bouthot BA et al. Effect of hepatitis C infection and renal transplantation on survival in endstage renal disease. *Kidney Int* 1998; 53: 1374-1381.
- Petrosillo N, Gilli P, Serraino D et al. Prevalence of infected patients and understaffing have a role in hepatitis C virus transmission in dialysis. *Am I Kidney Dis* 2001; 37: 1004-1010.
- Piccinino F, Sagnelli E, Pasquale G et al. Complications following percutaneous liver biopsy. A multicenter study on 68276 biopsies. *J Hepatol* 1986; 2: 165-173.
- Pinzani M. Liver fibrosis. *Springer Semin Immunopathol* 1999; 21: 475–490.
- Pinzani M. Fibrosis in chronic liver diseases: diagnosis and management. *J Hepatol* 2005; 42(S1): 22-36.
- Pohl A, Behling C, Oliver D et al. Serum aminotransferase levels and platlet counts as predictor of degree of fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *American Journal of Gastroenterol* 2001; 96: 3142-6.
- Poniachik J, Bernstein De, Reddy KR et al. The role of laparoscopy in the diagnosis of cirrhosis. *Gastrointest Endosc* 1996; 43: 568-571.

- Popper H, Uenfriend S. Hepatic fibrosis. Correlation of biochemical and morphologic investigations. *Am J Med* 1970; 49: 707–721.
- Poynard T, Aubert A, Bedossa P et al. A simple biological index for detection of alcoholic liver disease in drinkers. *Gastroenterology* 1991; 100: 1397–1402.
- Poynard T, Ratziu V, Bedossa P. Appropriateness of liver biopsy. *Can J Gastroenterol* 2000; 14: 543-548.
- Poynard T, Imbert-Bismut F, Ratziu V et al. Biochemical markers of liver fibrosis in patients infected by hepatitis C virus: longitudinal validation in a randomized trial. *J Viral Hepat* 2002; 9: 128–133.
- Poynard T, McHutchison J, Manns M et al. Biochemical surrogate markers of liver fibrosis and activity in a randomized trial of peginterferon alfa-2b and ribavirin. *Hepatology* 2003; 38: 481–492.
- Poynard T, Morra R, Halfon P et al. Meta-analyses of Fibrotest diagnostic value in chronic liver disease. *BMC Gastroenterol* 2007; 7: 40.
- Ramadori G, Zohrens G, Manns M et al. Serum hyaluronate and type III procollagen aminoterminal propeptide concentration in chronic liver disease. Relationship to cirrhosis and disease activity. *Eur J Clin Invest* 1991; 21: 323-30.
- Ramadori G, Saile B. Portal tract fibrogenesis in the liver. *Lab Invest* 2004; 84: 153–159.
- Regev A, Berho M, Jeffers LJ et al. Sampling error and intraobserver variation in liver biopsy in patients with chronic HCV infection. *Am J Gasstroenterol* 2002; 97: 2614-2608.
- Rosenberg WM, Voelker M, Thiel R et al. Serum markers detect the presence of liver fibrosis: a cohort study. *Gastroenterology* 2004; 127: 1704 –1713.
- Rossi E, Adams L, Prins A et al. Validation of the FibroTest biochemical markers score in assessing liver fibrosis in hepatitis C patients. *Clin Chem* 2003; 49: 450–454.
- Roulot D, Czernichow S, Le Clesiau H et al. Liver stiffness values in apparently healthy subjects: Influence of gender and metabolic syndrome. *J Hepatol* 2008; 48: 606-13.
- Rozario R, Ramakrishna B. Histopathological of chronic hepatitis B and C: a comparison of two scoring systems. *J Hepatol* 2003; 38: 223-229.
- Saab S, Martin P, Brezina M et al. Serum Alanine Aminotransferase in hepatitis C screening of patients on Hemodialysis. *Am J Kidney Dis* 2001; 37: 308-315.
- Safadi R. Immune stimulation of hepatic fibrogenesis by CD8 cells and attenuation by transgenic interleukin-10 from hepatocytes. *Gastroenterology* 2004; 127: 870–882.
- Sagir A, Erhardt A, Schmitt M et al. Transient elastography is unreliable for detection of cirrhosis in patients with acute liver damage. *Hepatology* 2008; 47(2): 592-595.

- Sahai A, Malladi P, Melin-Aldana H et al. Upregulation of osteopontin expression is involved in the development of nonalcoholic steatohepatitis in a dietary murine model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: G264–G273.
- Shaheen AA, Myers RP. Diagnostic accuracy of the aspartate aminotransferase-to-platelet ratio index for the prediction of hepatitis C-related fibrosis: a systematic review. *Hepatology* 2007; 46: 912–921.
- Sandrin L, Fourquet B, Hasquenoph JM et al. Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound Med Biol* 2003; 29: 1705-1713.
- Schaffner F, Klion FM. Chronic hepatitis. *Annu Rev Med* 1968; 19: 25–38.
- Scheuer PJ. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. *J Hepatol* 1991; 13: 372-374.
- Schulze-Krebs A, Preimel D, Popov Y et al. Hepatitis C virus replicating hepatocytes induce fibrogenic activation of hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2005; 129 (1): 246-58.
- Schwabe RF, Bataller R, Brenner DA. Human hepatic stellate cells express CCR5 and RANTES to induce proliferation and migration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 285: G949–G958.
- Seo YS, Um SH, Suh S et al. Changes in liver stiffness during the course of acute hepatitis A. *Korean J Hepatol* 2008; 14: 465-473.
- Shek FW, Benyon RC. How can transforming growth factor beta be targeted usefully to combat liver fibrosis? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 123–126.
- Shi Z, Wakil AE, Rockey DC. Strainspecific differences in mouse hepatic wound healing are mediated by divergent T helper cytokine responses. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94: 10663–10668.
- Sotil EU, Jensen DM. Serum enzymes associated with cholestasis. *Clin Liver Dis* 2004; 8: 41–54.
- Stehman-Breen C, Emerson S, Gretch D et al. Risk of death among chronic dialysis patients infected with HCV. *Am J Kidney Dis* 1998; 32: 629-634.
- Sterling RK, Lissen E, Clumeck N et al. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology* 2006; 43: 1317–1325.
- Streetz KL. Interleukin 6/gp130- dependent pathways are protective during chronic liver diseases. *Hepatology* 2003; 38: 218–229.

- Suskind DL, Muench MO. Searching for common stem cells of the hepatic and hematopoietic systems in the human fetal liver: CD34+ cytokeratin 7/8+ cells express markers for stellate cells. *J Hepatol* 2004; 40: 261–268.
- Takehara T. Hepatocyte-specific disruption of Bcl-xL leads to continuous hepatocyte apoptosis and liver fibrotic responses. *Gastroenterology* 2004; 127: 1189–1197.
- Taliani G, Badolato MC, Nigro G et al. Serum concentration of gammaGT is a surrogate marker of hepatic TNF-alpha mRNA expression in chronic hepatitis C. *Clin Immunol* 2002; 105: 279–85.
- Talwalkar JA, Kurtz DM, Schoenleber SJ et al. Ultrasound-based transient elastography for the detection of hepatic fibrosis: systematic review and metaanalysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5(10): 1214–1220.
- Teare JP, Sherman D, Greenfield SM et al. Comparison of serum procollagen III peptide concentration and PGA index for assessment of hepatic fibrosis. *Lancet* 1993; 342: 895-8.
- Thurman RG. Alcoholic liver injury involves activation of Kupffer cells by endotoxin. *Am J Physiol* 1998; 275: G605–G611.
- Trinchet JC, Hartmann DJ, Pateron D et al. Serum type I collagen and N-terminal peptide of type III procollagen in chronic hepatitis. Relationship to liver histology and conventional liver tests. *J Hepatol* 1991; 12: 139–144.
- Ueberham E. Conditional tetracyclineregulated expression of TGF-beta1 in liver of transgenic mice leads to reversible intermediary fibrosis. *Hepatology* 2003; 37: 1067–1078.
- Vallet-Pichard A, Mallet V, Nalpas B et al. FIB-4: an inexpensive and accurate marker of fibrosis in HCV infection. Comparison with liver biopsy and fibrotest. *Hepatology* 2007; 46: 32–36.
- Vinas O. Human hepatic stellate cells show features of antigen-presenting cells and stimulate lymphocyte proliferation. *Hepatology* 2003; 38: 919–929.
- Vispo E, Barreiro P, Del Valle J et al. Overstimulation of liver fibrosis staging using transient elastography in patients with chronic hepatitis C and significant liver inflammation. *Antiviral Ther* 2009; 14: 187-193.
- Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ et al. A simple non invasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38: 518–526.
- Walsh KM, Timms P, Campbell S et al. Plasma levels of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and tissue inhibitors of metalloproteinases-1 and -2 (TIMP-1 and TIMP-2) as noninvasive

markers of liver disease in chronic hepatitis C: comparison using ROC analysis. *Dig Dis Sci* 1999; 44: 624–630.

- Walsh KM, Fletcher A, MacSween RN et al. Basement membrane peptides as markers of liver disease in chronic hepatitis C *J Hepatol* 2000; 32: 325–330.
- Westin J, Lagging LM, Wejstal R et al. Interobserver study of liver histopathology using the Ishak score in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Liver* 1999; 19: 183–7.
- Williams EJ. Relaxin inhibits effective collagen deposition by cultured hepatic stellate cells and decreases rat liver fibrosis in vivo. *Gut* 2001; 49: 577–583.
- Wong JB, Koff RS. Watchful waiting with periodic liver biopsy versus immediate empirical therapy for histologically mild chronic hepatitis C. A cost-effectiveness analysis. *Ann Intern Med* 2000; 133:665-675.
- Wong GLH, Wong VWS, Choi PCL et al. Increased liver stiffness measurement by transient elastography in severe acute exacerbation of chronic hepatitis B. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24: 1002-1007.
- Yasuda K, Okuda K, Endo N. Hypoaminotransferasemia in patients undergoing long term hemodialysis clinical and biochemical appraisal. *Gastroenterology* 1995; 109: 1295-1299.
- Yoshida T. SOCS1 is a suppressor of liver fibrosis and hepatitis-induced carcinogenesis. *J Exp Med* 2004; 199: 1701–1707.
- Yoshiji H. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 attenuates spontaneous liver fibrosis resolution in the transgenic mouse. *Hepatology* 2002; 36: 850–860.
- Yu C. Role of fibroblast growth factor type 1 and 2 in carbon tetrachloride-induced hepatic injury and fibrogenesis. *Am J Pathol* 2003; 163: 1653-1662.
- Zampieron A, Javaseken H, Elseviers M et al. European study on epidemiology and management of hepatitis C virus infection in the haemodialysis population. Part 3: prevalence and incidence. *EDTNA ERCA J* 2006; 32: 42-44.
- Zaman A, Rosen HR, Ingram K et al. Assessment of FIBROSpect II to detect hepatic fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Am J Med* 2007; 120: 280.
- Zheng M, Cai WM, Zhao JK et al. Determination of serum levels of YKL-40 and hyaluronic acid in patients with hepatic fibrosis due to schistosomiasis japonica and appraisal of their clinical value. *Acta Trop* 2005; 96: 148 –152.
- Ziol M, Handra-Luca A, Kettaneh A et al. Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2005; 41(1): 48–54.